



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Departamento de Química Biológica

Parámetros de deterioro asociados a senescencia funcional en la mosca-plaga *C.capitata*.

Tesis presentada para optar por el título de Doctor en la Universidad de Buenos Aires en el área de Química Biológica

Lic. Pablo Alejandro Bochicchio

Director: **Dr. Luis Alberto Quesada Allué**
Consejero de estudios: **Dr. Eduardo Cánepa**

Laboratorio de Bioquímica y Biología Molecular del Desarrollo
IIBBA - CONICET - Fundación Instituto Leloir
2019
Buenos Aires, Argentina.

Índice

Resumen	pág. 3
Abstract	pág. 5
Abreviaturas	pág. 8
Capítulo 1. Introducción general	
1.1 <i>Ceratitis capitata</i> : la mosca mediterránea de la fruta como animal de estudio.	pág. 11
1.2 La metamorfosis	pág. 12
1.3 Sincronización de la emergencia en dípteros ciclorrafos.....	pág. 15
1.4 Control Hormonal.....	pág. 16
1.5 La vida adulta inicial de <i>C. capitata</i>	pág. 16
1.6 Sistemas experimentales de filmación de moscas.....	pág. 19
1.7 Hipótesis principal	pág. 20
1.8 Objetivos generales	pág. 20
Capítulo 2. Materiales y métodos generales	
2.1 Cría de <i>C. capitata</i> en el laboratorio	pág. 24
2.2 Selección de adultos machos para los ensayos	pág. 26
2.3 Medición de parámetros comportamentales	pág. 27
2.3.1 Lek experimental	pág. 27
2.3.2 Montado de las arenas experimentales y filmaciones del lek.	pág. 27
2.3.3 Identificación de animales en el lek	pág. 27
2.3.4 Longevidad de los lek	pág. 28
2.4 Análisis estadístico	pág. 28
Capítulo 3. Estudios complementarios de la transición adulto farado a adulto exarado.	
3.1 Introducción	pág. 30
3.2 Hipótesis	pág. 33
3.3 Objetivos	pág. 33
3.4. Materiales y métodos	pág. 33
3.4.1 Cuantificación de sustancias de reserva	pág. 33
3.4.2 Consumo de oxígeno	pág. 35
3.5 Resultados	pág. 37
3.5.1 Trehalosa	pág. 37
3.5.2 Glucógeno	pág. 38
3.5.3 Lípidos Totales	pág. 38
3.5.4 Consumo de Oxígeno	pág. 40
3.6 Conclusión y discusión	pág. 42
Capítulo 4. Última etapa de la metamorfosis: Transición de adulto farado a adulto exarado.	
4.1 Introducción	pág. 45
4.1.1 Comportamiento de extricación	pág. 45
4.1.2 Comportamiento de expansión	pág. 45
4.2 Objetivos	pág. 46
4.3 Materiales y métodos	pág. 46
4.3.1 Diseño de sistemas de filmación de moscas	pág. 46
4.3.2 Diseño del Sistema de captura de video <i>ad-hoc</i>	pág. 48
4.3.3 Análisis de trayectoria y actividad.	pág. 49
4.3.4 Arena experimental.....	pág. 50
4.3.5 Método de filmación.....	pág. 51
4.3.6 Ensayo de reacción in vitro de la actividad NBAD-sintetasa	pág. 52
4.4 Resultados.	pág. 53
4.4.1 Abandono del pupario, expansión y forma final del adulto.....	pág. 53
4.4.2 Esclerotización y tanificación de las alas del nuevo adulto.....	pág. 58
4.5 Conclusión y discusión.	pág. 68
4.5.1 Análisis de los eventos que acompañan la transición adulto farado-exarado.	
4.5.2 Comportamiento post emergencia.....	pág. 68

4.5.3 Coloración de las manchas marrones de las alas de <i>C. capitata</i>	pág. 70
Capítulo 5. Caracterización del perfil comportamental de machos en un lek de laboratorio.	
5.1 Introducción	pág. 75
5.2 Objetivos	pág. 78
5.3 Materiales y métodos	pág. 78
5.4 Resultados	pág. 80
5.4.1 Diseño y construcción de arena experimental <i>ad-hoc</i> para leks.	pág. 80
5.4.2 Establecimiento de los lek de laboratorio	pág. 82
5.4.3 Primeros momentos del lek.	pág. 84
5.4.4 Comportamientos individuales dentro del lek.....	pág. 86
5.4.4.1 Interacciones macho-macho dentro del lek.....	pág. 87
5.4.5 Determinación de perfiles comportamentales predominantes en un lek.	pág. 102
5.4.6 Caídas en el lek experimental.....	pág. 106
5.5 Conclusiones y discusión.....	pág. 108
Capítulo 6. El fenómeno de caídas supinas como posible indicador fisiológico.	
6.1 Introducción.....	pág. 114
6.2 Objetivos.....	pág. 118
6.3 Resultados	pág. 118
6.3.1 Eventos supinos observados durante el lek.....	pág. 118
6.3.2 Características temporales de las caídas en posición supina.....	pág. 120
6.3.3 Estudios de longevidad.....	pág. 125
6.3.4 Eventos supinos asociados a diferentes perfiles.....	pág. 126
6.3.4.1 Correlaciones de eventos.....	pág. 127
6.3.4.1 Confirmación de la asociación de eventos.....	pág. 131
6.4 Conclusión y discusión	pág. 135
Capítulo 7. Expresión génica asociada al comportamiento supino.	
7.1 Introducción.....	pág. 139
7.2 Objetivos	pág. 144
7.3 Materiales y métodos	pág. 145
7.3.1 Expresión diferencial de genes.....	pág. 145
7.3.2 Amplificación de mensajeros específicos.....	pág. 148
7.3.3 Secuenciación de genes.....	pág. 149
7.3.4 Construcción de ARN de interferencia.....	pág. 149
7.3.5 Medición de la respuesta geotáctica (RING).....	pág. 151
7.4 Resultados	pág. 153
7.4.1 Parte A: Análisis de expresión génica.....	pág. 153
7.4.2 Parte B: Corroboración de expresión diferencial por PCR en tiempo real..	pág. 175
7.4.3 Parte C: Estudios del gen turtle de <i>Ceratitis capitata</i>	pág. 181
7.5 Conclusiones y discusión.....	pág. 189
Conclusiones generales.	pág. 205
Material suplementario	pág. 212
Anexo teórico	pág. 236
Anexo estadístico	pág. 238
Bibliografía	pág. 259

Resumen

Parámetros de deterioro asociados a senescencia funcional en la mosca-plaga C. capitata.

En esta tesis se planteó estudiar la transición de adulto farado a exarado, utilizando como animal experimental *Ceratitis capitata*, conocida como la mosca del Mediterráneo (plaga distribuida mundialmente que ataca los huertos y frutales). Además de tratar de conocer en detalle los diferentes eventos, se focalizó el interés en ciertos aspectos relacionados con la senescencia funcional y demográfica de los dípteros. Partimos de la hipótesis de que características fisiológico-comportamentales en insectos jóvenes pueden estar reflejando el estado fisiológico funcional de los mismos. En el laboratorio se habían caracterizado previamente perfiles lipídicos de cerebro y otros tejidos, indicadores del grado de senescencia funcional. La intención general de la Tesis fue detectar algún parámetro indicador de senescencia que no implicara la muerte del insecto. Como objetivo general nos planteamos (a) el estudio de la “terminación” anatómica y fisiológica del individuo exarado y su primer etapa de actividad como insecto joven y (b) una vez conocidos los eventos determinar eventuales indicadores del estado de senescencia. Se estudió, por primera vez en un laboratorio, individuos en un lek experimental (reunión de machos) y los comportamientos asociados en el mismo. Para ello fue necesario el desarrollo de un escenario experimental original y de programas de computación específicos, completamente a cargo del autor de esta tesis. Se determinó por primera vez el perfil predominante de cada insecto en un lek experimental, analizándose tiempos de ocurrencia y características de los eventos. Entre los comportamientos analizados se puso en evidencia el posible valor de las caídas como reveladoras del estado fisiológico del individuo. Se descubrió así que la frecuencia de caídas espontáneas con aterrizaje en posición supina (“caídas supinas”= CS) correlacionaba con diferentes aspectos fisiológicos como el perfil comportamental general en el lek. Notoriamente el perfil de caídas supinas resultó un excelente indicador predictor de la longevidad promedio y máxima. Por tanto, se analizó y comparó el patrón subyacente de expresión génica en insectos con ninguna o menos de dos CS y en

aqueños con muchas CS. Se determinó la expresión diferencial general en cabezas, en particular focalizándonos en los grandes cambios en la expresión de genes relacionados con aquellos asociados a coordinación neuronal y estrés. Analizando genes asociados a ataxias en *Drosophila*, ortólogos de los de humanos, se demostró la importante sobreexpresión del gen *Turtle* en insectos con altas CS y por tanto menos longevos, y la de otros genes de alto interés.

Palabras clave: senescencia funcional, *lek*, *Ceratitis capitata*, expresión diferencial de genes.

Abstract

Deterioration parameters associated with functional senescence in the medfly C. capitata.

In this thesis it was proposed to study the transition from adult farado to exarado, using *Ceratitis capitata* as experimental model, also known as Mediterranean fruit fly (worldwide pest that attacks the orchards and fruit trees). In addition to trying to know in detail the different events, the interest was focused on certain aspects related to the functional and demographic senescence of dipterans. We hypothesized that physiological-behavioral characteristics in young insects may be reflecting their functional physiological state. Lipid profiles of brain and other tissues, indicators of the degree of functional senescence, were previously characterized in our laboratory. The general aim of the Thesis was to detect some parameter indicating senescence that did not imply the insect's death. The purpose of this work was: (a) to study the anatomical and physiological "termination" of the individual and its first activity stage as a young insect, and (b) once the events are known, to determine eventual indicators of the state of senescence. We studied, for the first time in a laboratory, individuals in an experimental lek (aggregation of males) and the associated behaviors in it. To this effect, developing an original experimental scenario and specific software was necessary, completely in charge of the author of this thesis. The predominant profile of each insect was determined for the first time in an experimental lek, analyzing occurrence times and characteristics of the events. Among the behaviors analyzed, the possible value of the falls was shown as revealing the physiological state of the individual. It was thus discovered that the frequency of spontaneous falls with supine landing ("supine falls" = CS) correlated with different physiological aspects such as the general behavioral profile in the lek. Notoriously the profile of supine falls was an excellent predictive indicator of the average and maximum longevity. Therefore, the underlying pattern of gene expression in insects with no or less than two CS and in those with many CS was analyzed and compared. The general differential expression in heads was determined, in

particular focusing on the large changes in the gene expression related to those associated with neuronal coordination and stress. Analyzing genes associated with ataxias in *Drosophila*, orthologs of those of humans, the significant overexpression of the Turtle gene in insects with high CS and therefore less long-lived, and that of other genes of high interest, were demonstrated.

Key words: functional senescence, *lek*, *Ceratitis capitata*, differential expression of genes.

Agradecimientos

A mi director de Tesis, Dr. Luis A. Quesada Allué, por permitirme realizar este trabajo en su laboratorio.

Al Dr. Alejandro Rabossi, co-director de mi Beca Doctoral CONICET, que colaboró en los experimentos, la discusión de resultados y la corrección de esta Tesis.

A mis compañeros del laboratorio durante estos años: Martín, Fabiana y Verónica, por la ayuda mutua y por su amistad.

A la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires.

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas (CONICET).

A toda la comunidad de la Fundación Instituto Leloir, por las facilidades otorgadas para realizar los experimentos para esta Tesis.

A los integrantes de mi Comité de Seguimiento de Tesis, los Dres: M. Fernanda Ceriani, Pablo Schilman y Laura Morelli, por sus consejos durante los últimos 5 años.

A los Dres: Celeste Leal, M. Elena Iezzi, Leandro Guttlein, Eduardo Cafferata y Santiago Werbaj por la ayuda otorgada para la puesta a punto de los experimentos moleculares.

Al Dr. Esteban Hernando por su colaboración en los análisis de expresión diferencial de genes.

A mi Familia, a Maca y a mis amigos por su incondicional apoyo.

Abreviaturas

°C	Grados centígrados
μL	Microlitros
μm	Micrómetros
μ _x	Tasa de mortalidad edad-específica
<i>a</i>	Tasa de mortalidad inicial
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	Ácido desoxirribonucleico copia
AM	Ante meridiano
ARN	Ácido ribonucleico
ARNi	Ácido ribonucleico interferencia
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
ATP	Adenosín trifosfato
<i>b</i>	Tasa de senescencia o Tasa de incremento en la mortalidad con la edad
<i>c</i>	Parámetro asociado a la mortalidad independiente de la edad
cm	Centímetros
CO ₂	Dióxido de carbono
CP	Componente principal
Da	Daltons
D.E.	Desvío estándar
dNTPs	Desoxirribonucleótidos trifosfato
E	Exponencial de base 10 (por ejemplo: 1E-03 es igual a 1x10 ⁻³)
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético (siglas del inglés <i>ethylenediaminetetraacetic acid</i>)
ES	Error estándar
eV	Electronvoltio
<i>g</i>	Unidad de aceleración de la gravedad
g	Gramos
h	Horas
HCl	Cloruro de hidrógeno
HSP	Proteína de choque térmico (siglas del inglés <i>heat shock protein</i>)

L	Litros
m	Metros
M	Molaridad
mA	Miliamperios
mg	Miligramos
min	Minutos
mL	Mililitros
mm	Milímetros
mM	Milimolar
nd	No detectado
ng	Nanogramos
nm	Nanómetros
p	Valor p de la prueba
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (siglas del inglés <i>Polymerase Chain Reaction</i>)
pH	Potencial de hidrógeno
PM	Post meridiano
<i>r</i>	Coefficiente de correlación de Pearson
rpm	Revoluciones por minuto
<i>s</i>	Desaceleración de la tasa de mortalidad a edades avanzadas
u.a.	Unidades arbitrarias
UV	Ultravioleta
V	Voltios
v/v	Porcentaje de volumen en volumen

Capítulo 1. Introducción general

1. Introducción general

1.1 *Ceratitis capitata*: la mosca mediterránea de la fruta como animal de estudio.

La familia de los tefrítidos, cuyos miembros son conocidos como las “verdaderas moscas de la fruta”, está compuesta aproximadamente por unas 5100 especies ordenadas en 500 géneros (White & Elson-Harris, 1992). Además de ser, en cuanto al número de especies, una de las familias más grandes del Orden Díptera, es una de las de mayor importancia económica. Cerca del 35% de las especies de esta familia ataca a una amplia variedad de frutas silvestres y comerciales, otro 40% se desarrolla en las flores de la familia Compositae, mientras que el resto de las especies se encuentran asociadas a flores de otras familias (White & Elson-Harris, 1992). Los tefrítidos se han distribuido por todas las áreas tropicales, sub-tropicales y templadas del mundo. La mosca del Mediterráneo, *Ceratitis capitata* (Wiedemann) es un díptero polífago originario de África occidental que se ha extendido en más de 90 países en el mundo y la variedad de hospederos incluye más de 250 especies de frutas y hortalizas. Este insecto se detectó por primera vez en el continente americano en 1901 cuando se comunicó su presencia en Brasil. Posteriormente en Uruguay durante 1932 y en Argentina en el año 1934 (Quesada-Allué, 1994). En regiones de clima templado, se producen de 3 a 5 generaciones de moscas al año, mientras que en las regiones más cálidas, las moscas de la fruta adultas permanecen activas durante todo el año (Carey, 1993).

Ceratitis capitata es un díptero ciclorrafo perteneciente a la familia Tephritidae. La mosca adulta es un pequeño insecto de no más de 5 mm de largo, de alas triangulares, con zonas de color anaranjado, pardo, negro y blanco. El macho se distingue por sus vibrisas espatuladas ubicadas a ambos lados de los ocelos, y el abdomen terminal redondeado (Figura 1B y C). La hembra, por su parte, exhibe un abdomen terminal puntiagudo debido a un conspicuo ovipositor (Figura 1A) (Quesada-Allué, 1994). Las hembras fecundadas insertan los huevos dentro de las frutas mediante el ovipositor retráctil, en cada puesta depositan de 1 a 10 huevos de aproximadamente 1 mm de profundidad debajo de la piel de la fruta. Ponen hasta 21 huevos por día y 800 huevos

durante toda su vida (White & Elson-Harris, 1992). Los huevos se depositan debajo de la piel en las frutas maduras o en las áreas rotas de la piel. Después de que los huevos eclosionan, las larvas comienzan a comer rápidamente, haciendo túneles en un área diferente de la fruta. Al finalizar la etapa larval, esta abandona la fruta y la larva se entierra algunos centímetros en el suelo donde inicia la metamorfosis.



Figura 1 Mosca del Mediterráneo *Ceratitidis capitata*. (A) Dibujo de una hembra adulta. (B) Dibujo de un macho adulto. (C) Fotografía de un macho adulto. Los dibujos fueron tomados de (Quesada-Allué, 1994).

Al tratarse de una mosca plaga de importancia económica mundial, se han estudiado intensamente diferentes aspectos en la biología de *Ceratitidis*, como ser distribución y hospederos, comportamiento de alimentación, requerimientos nutricionales, comportamiento de cópula, feromonas de atracción y cópula, comportamiento de ovoposición, susceptibilidad a parásitos y predadores, citogenética y determinación del sexo, por citar algunos de los tópicos más importantes (Thompson & Society, 1998).

1.2 Metamorfosis

Los cambios comportamentales a lo largo de la vida del individuo están influenciados por cambios en el perfil hormonal, fisiológico y morfológico (Sachser et al., 2013; Truman & Riddiford, 1999; White & Ewer, 2014) y el perfil de moléculas de reserva (Bochicchio et al., 2017; Pujol-Lereis et al., 2016; Pujol-Lereis et al., 2012).

La metamorfosis produce dramáticos cambios estructurales en los insectos holometábolos. Estos cambios no son solo cambios mediados por el cerebro y centros endócrinos del insecto. El éxito de la metamorfosis requiere comportamientos

específicos, que deben ser desplegados en tiempo y forma precisa (Denlinger & Zdarek, 1994).

Las moscas son insectos holometábolos que sufren una drástica transformación desde la larva (relativamente simple, con forma agusanada sin patas ni alas) hasta el adulto activo, volador y reproductor. En las moscas esta transformación transcurre dentro de un "casarón" protector llamado pupario generado a partir de la cutícula larval III, endurecida y coloreada, dentro del cual transcurren la transición como prepupa y 2 estadios, el de pupa y el de adulto farado (Rabossi et al., 1991; Rabossi et al., 1992).

Existe una amplia bibliografía sobre el metabolismo durante la metamorfosis de cicloráfidos (Agrell, 1953; Frew, 1929; Merkey et al., 2011; Nestel et al., 2005; Rivera-Ciprian et al., 2017; Tolmasky et al., 2001).

En los Dípteros, al finalizar la metamorfosis, el adulto farado utiliza el *ptilinum* para abrir el opérculo del pupario, iniciando el proceso de extricación (Reid et al., 1987), dando lugar a la transición adulto farado-adulto exarado (Denlinger & Zdarek, 1994; Miyan, 1989). Para escapar del pupario, los dípteros utilizan la contracción coordinada de todos los segmentos del cuerpo, no solo la cabeza. Se han identificado músculos particularmente involucrados en la extricación en el abdomen, tórax y cabeza (Miyan, 1989).

Los comportamientos asociados a la emergencia de los adultos han sido estudiados en detalle en moscas de los géneros *Drosophila*, *Musca*, *Sarcophaga* y *Glossina* (Bainbridge & Bownes, 1981; Zdarek & Denlinger, 1993; Ždarek & Denlinger, 1987). Hasta donde sabemos, más allá de los esfuerzos empleados en el estudio de la erradicación de la mosca plaga *Ceratitis capitata*, no hay registros de trabajos que reporten un análisis detallado de la emergencia en tefrítidos.

Durante la fase de larva a pupa, primera etapa de la metamorfosis, la mayoría de los tejidos larvales son histolizados y la mayoría de sus componentes son reciclados para dar lugar a la generación primero del estadio intermedio pupal y luego del animal adulto por parte de los discos imaginales e histolizados (Rabossi et al., 1991; Rabossi et al., 2004;

Truman, 1990). Obviamente, durante toda esta etapa, el insecto no se alimenta, por lo que la energía requerida para completar la metamorfosis debe ser adquirida mediante alimentación durante los estadios larvales (Boggs, 2009; Boggs & Freeman, 2005; Tolmasky et al., 2001). Como en todos los insectos holometábolos, durante el último estadio larval las reservas energéticas se almacenan principalmente en el cuerpo graso como lípidos y glucógeno (Nestel et al, 2003, Tolmasky et al, 2001). El cuerpo graso larval también sufre histólisis durante la metamorfosis, y en *Ceratitis*, Rabossi (2001) demostró que la degradación de este tejido ocurre en sentido antero-posterior y que parte del cuerpo graso larval localizado en los últimos 4 segmentos persiste hasta la emergencia del adulto. Finalmente, estas células mueren durante las 72 horas posteriores a la emergencia del adulto (Tolmasky et al., 2001) . Esto demuestra que las reservas energéticas acumuladas durante la última etapa larval no sólo son importantes durante la metamorfosis, sino también durante las primeras horas de vida adulto (Aguila et al., 2007; Hoshizaki, 2005).

Los diferentes eventos que ocurren durante la metamorfosis son el producto del cambio de un programa de expresión de genes larvales (principalmente de alimentación) por un programa de expresión de genes del insecto adulto (principalmente estructurales, de dispersión y reproducción) que ocurre fundamentalmente en sistema nervioso y discos imaginales (Chen et al., 2016; Graveley et al., 2011).

Trabajos realizados en nuestro laboratorio permitieron disponer de una datación horaria precisa de la metamorfosis y eventos tempranos del desarrollo (Boccaccio & Quesada-Allué, 1989; Pérez et al., 2018; Quesada-Allué, 1994; Rabossi et al., 1991; Rabossi et al., 1992); siendo posible establecer una relación entre la aparición de características morfológicas externas, eventos moleculares y la extensión en el tiempo de los principales programas del desarrollo temprano de *C. capitata*. La Figura 2 muestra el ciclo de vida estándar a 23°C de *C. capitata*, con horarios, eventos y características establecidos en nuestro laboratorio.

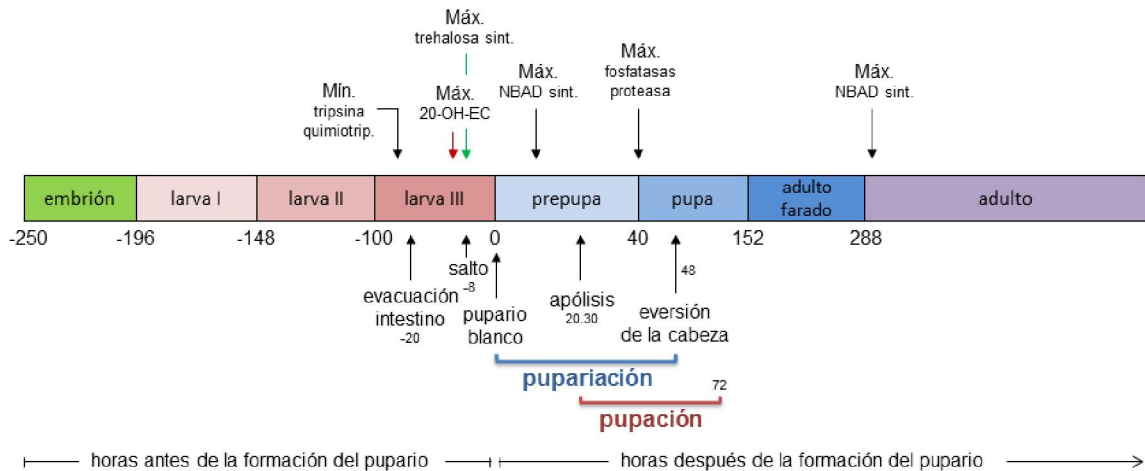


Figura 2 . Resumen de los principales eventos macroscópicos y moleculares estudiados en nuestro laboratorio durante el ciclo de vida de *Ceratitis capitata* a 23°C. La edad de los insectos está expresada respecto del tiempo cero, en horas, antes y después de la formación del pupario. Las flechas de la parte superior indican los horarios en los que se midieron máximos de actividad enzimática y deposición de proteínas. La flecha roja indica el máximo de 20-hidroxi-ecdisona (20-OH-EC). En la parte inferior se indican cambios comportamentales y morfológicos, y se muestran el inicio y el final de la pupariación (azul) y de la pupación (rojo). El largo de las etapas en el esquema no es proporcional al tiempo real. Sint.: sintetasa; Mín.: mínimo; Máx.: máximo; NBAD: N-β-alanil dopamina; quimiotrop.: quimiotropina.

Es de particular interés para esta tesis el estudio de la transición adulto farado a adulto exarado, ya que este período es particularmente sensible a diferentes tipos de estrés y su perturbación provoca alteraciones en la emergencia del adulto y posterior estado funcional del insecto en su vida adulta (Barry et al., 2003; Berni et al., 2003; Pujol-Lereis et al., 2010).

1.3 Sincronización de la emergencia en dípteros ciclorrafos

El momento de la emergencia del pupario está determinado por el ritmo circadiano del insecto. En la mayoría de las especies la sincronización por ciclos de luz-oscuridad ocurren antes de la pupariación (Myers, 2003). Luego de la pupariación hay pérdida de fotosensibilidad, sin embargo el ritmo persiste durante toda esta etapa, esto podría deberse a la presencia de otros sincronizadores exógenos (Zeitgeber) como ser ciclos de temperaturas (Denlinger & Zdarek, 1994) y humedad relativa (De et al., 2012). Incluso existe evidencia que indica que el ritmo de emergencia de *D. melanogaster* es mucho

más robusto en poblaciones naturales que aquellas mantenidas en condiciones de laboratorio, sincronizadas solo por periodos de luz y oscuridad. Esto sugiere la presencia de otros posibles *Zeitgebers* en la naturaleza (De et al., 2012).

1.4 Control hormonal

El descenso de los niveles de hormonas esteroides circulantes es considerado como la clave interna del insecto que da fin a la metamorfosis y el inicio de la emergencia (Myers, 2003; Truman et al., 1983). Por otro lado, estudios en *D. melanogaster* han demostrado que los comportamientos asociados a la emergencia del adulto están regulados por al menos 6 neuropéptidos (Davis et al., 2007; Truman & Riddiford, 2002). Se ha propuesto al neuropéptido bursicon como el regulador de la extensión de las alas y la coloración de su cutícula. Este tetrapéptido es producido en sistema nervioso central y es secretado a la hemolinfa, donde es distribuido hasta las células epidérmicas (Peabody et al., 2008; 2009; 2013). El bursicon fue descrito por primera vez en dípteros, pero está reportado en numerosos procesos de tanificación en otros insectos (Denlinger & Zdarek, 1994; Luo et al., 2005). La figura 3 muestra los dos modelos actuales de coordinación hormonal de la emergencia.

1.5 La vida adulta inicial de C. capitata

Las primeras horas después de la ecdisis del pupario han merecido significativa atención en esta tesis, ya que existen relativamente pocos datos sobre ese período. Luego de la emergencia de los adultos, transcurren entre 4 y 7 días para que las hembras estén en condiciones de que se produzca el cortejo y el apareamiento, y ambos comportamientos ocurren al atardecer (Jang et al., 1989). En cuanto a los machos, a partir de los 3 o 4 días después de la emergencia, comienzan a mostrar actividad sexual (Whittier et al., 1992).

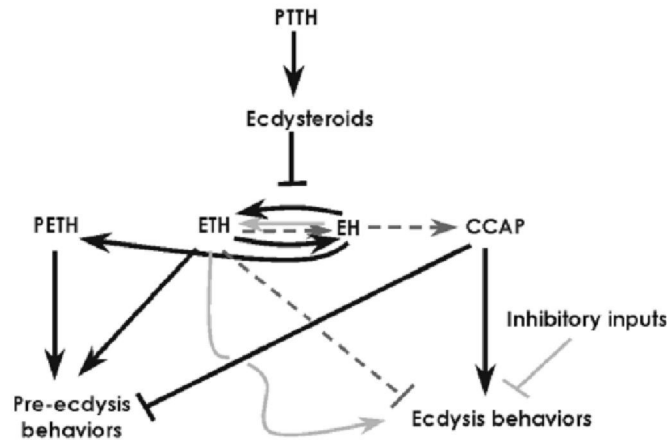


Figura 3. Modelos de control hormonal de la ecdisis. Existen dos modelos, los componentes en común entre ambos modelos están dibujados en líneas sólidas negras. Los detalles del modelo 1 están marcados en línea punteada, mientras que los del modelo 2 están marcados en líneas sólidas grises. Durante el desarrollo la PTH activa la síntesis de ecdisteroides en el PG. Cuando los niveles de ecdisteroides descienden se desencadena la ecdisis. En los dos modelos PETH y ETH controlan los comportamientos de pre-ecdisis. En el modelo 1 EH causa el aumento de la CCAP iniciando los comportamientos de ecdisis. En el modelo 2 ETH, en vez de EH, activa a CCAP. CCAP activa la ecdisis sólo cuando las entradas de inhibiciones desde el ganglio torácico y cefálico son removidas. Las flechas indican estimulación, las líneas con barra en su extremo indican inhibición. Tomado de Myers (2003). Abreviaciones: CCAP, crustacean cardioactive peptide; EH, eclosion hormone; ETH, ecdysis triggering hormone; PETH, pre-ecdysis triggering hormone; PG, prothoracic gland; PTH, prothoracicotropic hormone.

El comportamiento del adulto de *C. capitata* ha sido estudiado desde distintos puntos de vista en condiciones de laboratorio, naturales y de semi-cautiverio (Arita H. & Kaneshiro, 1985; Shelly, 1987; Shelly & Whittier, 1997; Yuval et al., 2002; Yuval et al., 1998). Estos y otros autores describieron cinco posibles comportamientos principales: 1- (Realizado por ambos sexos) alimentación, que se define arbitrariamente como la extensión de la proboscis y repetitivos contactos de esta con la comida; 2 - (Realizado sólo por machos) "lek", definido como la agregación de tres o más machos, donde por lo menos uno de ellos está segregando feromonas por la glándula anal. Generalmente, esta actividad se observa en hojas o frutos. Esta forma de agrupamiento implica una gran actividad de los machos y frecuentes peleas. Los machos inician la actividad de agregación (lek) al medio día y así, la emisión de feromonas para atraer a las hembras. Al final de la tarde, la actividad de agregación cesa y los machos se dispersan e inician la búsqueda de alimento. 3 - (Realizado sólo por machos) espera en la fruta, los machos aguardan en la fruta la posible llegada de una hembra; 4 - (Realizado sólo por hembras)

ovipuesta, contiene a los eventos de pre- y post-ovoposición. Las hembras oviponen desde el mediodía y al final de la tarde se alimentan; 5 - (Realizado por ambos sexos) reposo, definido arbitrariamente como el comportamiento de estar quieto durante un período variable de tiempo. Tanto las hembras como los machos reposan desde la madrugada hasta aproximadamente las 8 am.

En esta tesis hemos focalizado nuestro interés en un comportamiento social muy peculiar, el *lek*. Como se mencionó, los machos de *Ceratitis* establecen *leks* y realizan toda una serie de actividades denominadas de "*lekking*". Sin embargo, este es, es su conjunto, un comportamiento pre-cortejo relativamente poco común en insectos.

Se ha identificado comportamiento interpretable como de *lek* en otros grupos de animales como ser anfibios (Halliday & Verrell, 1988), aves (Avery, 1984), mamíferos (Halliday, 1983) e incluso algunos artrópodos (Alcock, 1987; Höglund & Alatalo, 2014; Howard et al., 2011). Formalmente se define al *lek* como una agregación de machos, con la intención de cada uno lograr cortejar a la hembra y aparearse. Dentro del *lek*, los machos realizan exhibiciones sexuales. Las agregaciones de machos pueden estar áreas próximas a las hembras o en áreas donde es probable que las hembras atraviesen (Aspbury & Gibson, 2004; Lank et al., 1995).

El perfil comportamental de la mosca antes y durante el cortejo

El perfil comportamental de un individuo representa la suma de características asociadas a rasgos comportamentales como: comportamiento social, habilidades cognitivas, como así también respuesta a estrés (Heiming & Sachser, 2010). Este perfil puede variar entre individuos de una misma especie, otorgándole una "personalidad" diferente a cada insecto (Heiming & Sachser, 2010; Müller & Tremmel, 2012). Comprender dicha variación es de gran importancia porque con frecuencia está relacionado con diferencias en el éxito reproductivo, susceptibilidad a enfermedades, la calidad de vida (Sachser et al., 2011) y eventualmente senescencia.

Desde hace años nuestro laboratorio ha estudiado en detalle las diferentes etapas de la metamorfosis de insectos empleando a *Ceratitis capitata* como modelo.

Recientemente se ha focalizado interés en la transición de adulto farado a exarado, especialmente en ciertos aspectos relacionados con la senescencia funcional y demográfica de *Ceratitis*. Se estudiaron así marcadores que reflejaron el estado funcional de los individuos, independientemente de la edad cronológica. Pujol-Lereis y colaboradores (Pujol-Lereis et al., 2012) encontraron que ciertos patrones de lípidos de las células en las moscas pueden ser utilizados para construir índices que sirven como indicadores del estado funcional de los individuos; pudiendo discriminar entre poblaciones mantenidas bajo diferentes condiciones ambientales. A su vez, se estudiaron subpoblaciones de moscas con diferentes niveles de respuesta a un estrés térmico por enfriamiento, con el objetivo de comprender las diferencias ocasionadas en el estado de senescencia funcional. Se demostró que subpoblaciones con parámetros de senescencia demográfica distintos, presentaron diferencias claves en sus patrones de lípidos y esto correlacionaba con su comportamiento y la expresión de genes relacionados a respuesta a estrés (Pujol-Lereis et al., 2016).

En esta tesis se planteó analizar eventos comportamentales durante el desarrollo de *lek* en machos de *Ceratitis capitata*, con especial interés en el estado de senescencia funcional y por tanto en el análisis de parámetros moleculares asociados.

1.6 Sistemas experimentales de filmación de moscas

Los sistemas de video-monitoreo permiten la recopilación de datos en forma detallada y precisa, que junto con su bajo costo y versatilidad, los ha vuelto populares (Gilestro, 2012). Los sistemas de registro y análisis publicados fueron desarrollados especialmente para estudios del sueño y/o patrones específicos en el comportamiento de la mosca modelo *D. melanogaster* (Colomb et al., 2012; Gilestro, 2012; Gomez-Marin et al., 2012; Noldus et al., 2001; Zou et al., 2011). Estos sistemas se basan en el análisis de individuos aislados, independientes uno del otro (Gilestro, 2012; Zou et al., 2011) o por el contrario, en aquellos que emplean varias moscas en la misma arena, se sugiere la ablación de alas para evitar el vuelo (Branson et al., 2009). Por otro lado, existen en el mercado diferentes dispositivos que permiten analizar el comportamiento seriado de animales (EthoVision® y TriKinetics®, por citar los más conocidos).

1.7 Hipótesis principal

Como hipótesis general se asumió la posibilidad de que características fisiológico-comportamentales en individuos jóvenes estén reflejando el estado funcional de los mismos y, eventualmente el estado de senescencia funcional.

1.8 Objetivos

El objetivo de esta tesis fue estudiar por primera vez en detalle, parámetros que caracterizan la transición desde la emergencia del pupario hasta el desarrollo de actividades del macho adulto en la particular situación de *lek*. Para ello se planteó primero estudiar por primera vez la “terminación” anatómica y fisiológica del individuo exarado y conocer a fondo la primera etapa de actividad en la población. Seguidamente, se deseó relacionar diferentes características fisiológicas (comportamentales y moleculares) de machos de *C. capitata* con su longevidad y otros parámetros. Después de los primeros estudios el énfasis se puso en el eventual valor de las caídas en situación de *lek*, como posibles reveladoras del estado fisiológico del individuo y en el estudio del patrón de expresión génica subyacente.

Objetivos concomitantes

Debido al relativamente escaso conocimiento de numerosos eventos del ciclo de vida de *C. capitata* resultó necesario abordar varios estudios complementarios.

Organización general de la tesis

Para el desarrollo de las diferentes actividades requeridas durante la tesis fue necesario implementar diferentes estrategias, que para mayor claridad hemos expuesto en forma de capítulos.

- En el primer capítulo se estudió la caracterización metabólica de la transición adulto farado a adulto exarado.
- En el segundo capítulo se estudió en detalle la extricación y los primeros eventos hasta el despliegue de alas.

- Como esta etapa era totalmente desconocido y de interés para la caracterización del adulto funcional, en el tercer capítulo se estudió la terminación anatómica del cuerpo, en particular de las alas (dureza y manchas).
- En el cuarto capítulo se explican los resultados de la implementación, por primera vez en un laboratorio, de un *lek* experimental de la mosca mediterránea y del estudio de los patrones comportamentales individuales.
 - Como los dispositivos comerciales y diseños tradicionales no nos permitieron amar un buen modelo de *lek*, hubo necesidad de crear un dispositivo *ad-hoc* satisfactorio, esto fue: diseño, construcción y selección de arenas adecuadas al estudio de los diferentes comportamientos y sistema de filmación.
 - Se estudió detalladamente durante el *lek* el desarrollo de interacciones entre los machos en función del tiempo, caracterizando perfiles comportamentales (movilidad y características).
- En el tercer capítulo se focalizó el estudio en el particular comportamiento de caídas supinas.
 - Se estudió la frecuencia de caídas durante el *lek*, en particular el de las caídas supinas (posición invertida sobre su dorso). Se analizaron las caídas espontáneas, y en particular, la correlación del número de caídas con otros parámetros así como con la eventual relevancia del tiempo de recupero.
 - Se estableció, por primera vez, la correlación de las caídas supinas con el perfil predominante de cada individuo en el *lek*.
 - Se estableció la correlación de las caídas con otros parámetros, especialmente, la correlación con longevidades (media y máxima) y la posibilidad de predicción de longevidad in vivo.

- En el cuarto capítulo se analizó la expresión génica en cerebro con los patrones de caídas supinas.
 - Se estudió por primera vez la expresión diferencial asociada a un comportamiento con fenotipo inusual similar a una ataxia.
 - Se comparó la expresión génica en machos que exhibieron muchas caídas supinas con la de aquellos que tuvieron 2 caídas o menos. Para ello se efectuó un análisis de secuenciación completa de ARN mensajeros en cabeza. Comparando la expresión entre ambos perfiles y focalizando el interés en los cambios cuantitativos más notorios y/o relevantes.
 - Se confirmaron resultados mediante PCR en tiempo real. En particular se revalidó la expresión de genes “atáxicos” y genes codificantes de enzimas antioxidantes.
 - Finalmente, se puso a punto de la técnica de ARN de interferencia y se obtuvieron resultados preliminares.

Capítulo 2.
Materiales y métodos generales

2. Materiales y métodos generales

2.1 Cría de *C. capitata* en el laboratorio

Se trabajó con la cepa salvaje de *Ceratitis capitata*, Mendoza DOZ-1, que se mantiene en nuestro laboratorio desde hace más de 15 años. La población de *Ceratitis* se mantiene a 23°C, 50-60 % de humedad relativa, con foto-periodo luz-oscuridad 16 - 8 h, en cámara de cría Conviron modelo CMP 3244.

Mantenimiento de la población de laboratorio.

Adultos

Los imagos de ambos sexos son mantenidos, en número no superior a 200, en frascos de 3750 ml. Los frascos llevan tapa de goma espuma (poliuretano) a fin de permitir el libre intercambio de gases y al mismo tiempo impedir que las moscas se escapen. Los insectos adultos se alimentan con una mezcla de sacarosa-levadura (3:1) y el agua se suministra en forma de gel de agar 1 %. Se utilizan recipientes de 20 ml y la reposición se realiza una vez por semana (Figura 4).

Oviposición y recolección de huevos

Los huevos se colectan a partir de los 7 días de edad de los adultos. Para la recolección de los mismos se utilizan frutas artificiales de plástico (Quesada-Allué, 1994). Las frutas tienen un orificio de 1,5-2,0 cm de diámetro donde se coloca un corcho que sujeta un pedazo de goma espuma, que se moja con agua para mantener el interior de la fruta saturado de humedad. Este dispositivo (ver Figura 4) cuelga hacia el interior, suspendido con un alambre de la boca del frasco. Tras un período de ovipuesta de dos horas, que permite una alta sincronización de los cultivos, se retiran las frutas. Para la recolección de los huevos, se quita el corcho y se agrega aproximadamente 1mL de agua destilada, se agita vigorosamente con el orificio tapado y se vierte el líquido con los huevos arrastrados sobre un papel de filtro colocado en un embudo. Después del filtrado, se agrupan cuidadosamente los huevos con una espátula en círculos de papel de diámetro no superior a 1,5 cm, y se los apoya sobre el medio de cultivo para larvas (ver abajo), contenido en una cubeta. En el paso anterior es crítico que el papel permanezca siempre húmedo. Para cultivos pequeños (50-200 huevos) se utilizan

cubetas con 30mL de medio y para cultivos grandes (hasta 1000 huevos) cubetas de 60mL de medio.

Para cultivos pequeños (50-200 huevos) se utilizan cubetas con 30ml de medio, para cultivos grandes (hasta 1000 huevos), cubetas de 60 ml de medio.

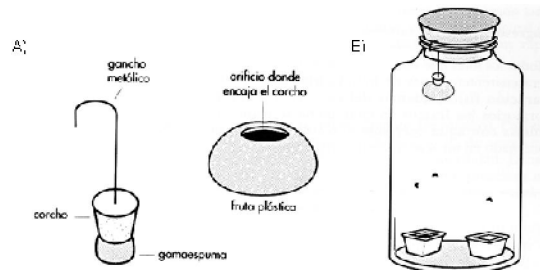


Figura 4. A) Fruta artificial utilizada para la recolección de los huevos, y B) frasco de cría de adultos de *Ceratitis capitata*.

Desarrollo larval

Los tres estadios larvales se desarrollan en el medio de cultivo donde fueron colocados los huevos, que debe mantenerse húmedo. Las cubetas se depositan en el fondo del frasco, sobre un lecho de arena fina tamizada y esterilizada por calor. Al finalizar el tercer estadio larval, las larvas abandonan el medio de cultivo saltando a la arena a 23°C, la etapa larval dura en promedio unos 10 días. El tiempo de salto se dispersa a lo largo de aproximadamente una hora dependiendo del tiempo de oviposición y del comportamiento individual. A los 3 días de la inmovilización definitiva de la larva e inicio de la metamorfosis se tamiza la arena para separar las pupas, que se colocan en los frascos donde se mantendrán los adultos luego de la emergencia.

Medio de cultivo para larvas de C. capitata.

La dieta fue preparada según Pujol-Lereis (2006), que consta de 500 g de zapallo crudo rayado se mezcla con 500 g de puré de zapallo cocido, 500 g de harina de maíz amarillo (polenta) pre cocido, 250 g de azúcar blanca, 100 g de levadura de cerveza Virgen en polvo y jugo de durazno comercial (se eligió la marca Baggio®) hasta obtener una consistencia de gel ligero. Luego se agregaron como conservantes 3,5 g de benzoato de sodio, disueltos en 20mL de agua, y 10mL de una solución de Nipagin 0,1 g/mL en etanol. La mezcla se homogeniza y se lleva a pH 4,5 con HCl.

2.2 Selección de adultos machos para los ensayos

Los adultos machos son seleccionados al azar luego del cuarto día desde la emergencia. Para evitar anestesiar la población total de moscas, se utiliza una aspiradora *ad hoc*, desarrollada por mi durante la tesis de grado, Bochicchio (2012). Este dispositivo consta de un fuelle accionado con el pie al que se le adosa un tubo de vidrio transparente de 1 cm de diámetro interno y 30 cm de largo, el cual desemboca en una trampa de vacío transparente (Figura 5).

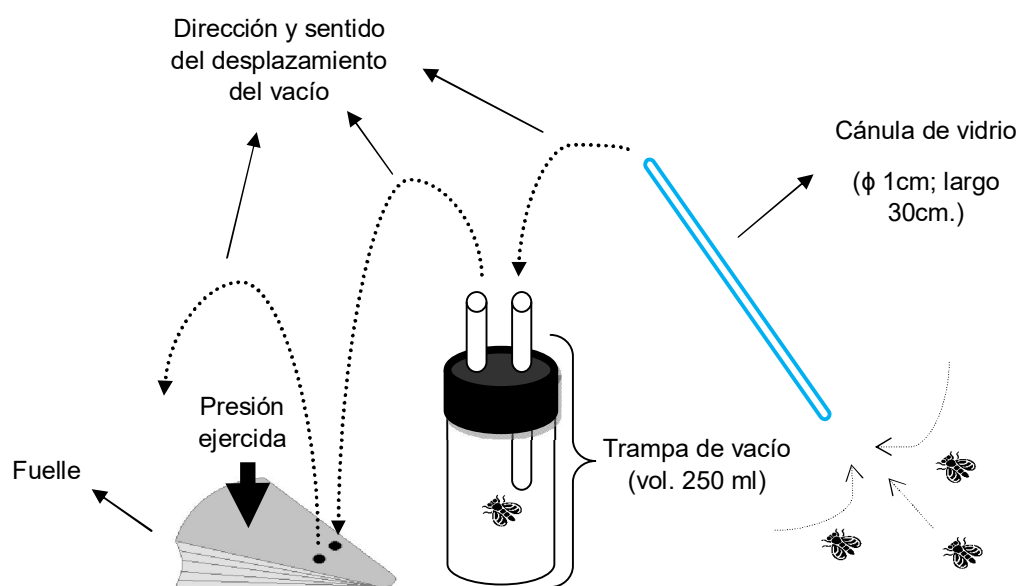


Figura 5. Esquema del dispositivo para captura de moscas desarrollado y utilizado para la toma de muestras (el esquema no está a escala). Tomado de Bochicchio (2012).

2.3 Medición de parámetros comportamentales

Las luces del escenario se encendieron a las 8 am (ZT-0) y se apagaron a las 12 pm (ZT-16), completando un ciclo de luz-oscuridad de 16:8. El encendido y apagado fue automatizado empleando un programa de computadora especialmente diseñado para esta tesis (ver resultados capítulo 5). La temperatura fue de 23 grados y la humedad relativa de ambiente fue de 50-60%.

2.3.1 Lek experimental

2.3.2 Montado de las arenas experimentales y filmaciones del lek.

Los recipientes experimentales se montaron el día anterior de cada experimento, se los lavó agua y detergente neutro 1% v/v, se enjuagó con agua y por último se enjuagó con alcohol 70% v/v. Una vez seco, se procedió a colocar el papel opaco, homogenizando la luz dentro de la pecera (ver resultados capítulo 5). Estos pasos se repitieron sistemáticamente para cada ensayo.

El registro de actividades dentro del *lek* fue desde el 5to día hasta el 10mo día de edad inclusive. Las cámaras de video se encendieron a las 14hs y se apagaron a las 16hs. Recopilando un total de 6 videos de 2hs de duración cada uno, es decir 12hs de video por réplica.

A partir de los videos obtenidos durante el período ventana de observación se midieron distintos parámetros comportamentales como ser el número de caídas espontáneas e inducidas, interacción macho-macho, la distancia recorrida y la longevidad.

Es importante destacar que recién al 5to día de edad comenzó la filmación, por lo tanto ya sea para los animales en solitario como para los *lek*, los animales tuvieron 24hs de recuperación y habituación en el recipiente experimental.

2.3.3 Identificación de animales en el lek

Se utilizó pintura acrílica color blanco (código 7301; Plantec®, Argentina). Se escogió pintura acrílica ya que está elaborada en base acuosa, insoluble en la cutícula de los insectos y no posee volátiles que interfieran en los ensayos. Se empleó el color blanco ya que permitió mejor contraste sobre el fondo marrón de la cutícula de las moscas y de esta forma facilitó la identificación del insecto a ojo desnudo.

2.3.4 Longevidad de los lek

Al 10mo día, luego de finalizada la etapa de observación, las moscas fueron transferidas de la arena experimental a un frasco de 300 ml (mismo volumen que el de la pecera experimental). En este procedimiento, se empleó una trampa de vacío para evitar un nuevo evento de anestesia. Cada grupo de moscas constituyentes del *lek*, ahora contenido en frascos, fue mantenido en la cámara de cría general y los insectos muertos fueron removidos diariamente.

2.4 Análisis estadístico

Para todo el análisis estadístico se utilizó el lenguaje de programación R (versión 3.2.3) y el empleo de la consola RStudio (versión 0.98.1091).

Análisis univariado

Para el análisis variables cuantitativas continuas se utilizó el modelo de cuadrados mínimos generalizados (gls), la elección del mejor ajuste se resolvió mediante el valor de Akaike (AIC). Se empleó el test no paramétrico Kruskal-Wallis (1952) para la comparación de medianas sólo en los casos que las muestras no cumplieron distribución normal y no se pudo modelar la variable respuesta. Para las inferencias simultáneas en parejas se utilizó el test de Dunn (1964).

Para el análisis del número de caídas donde se compararon los tratamientos lek vs. solitarios se utilizó el modelo lineal generalizado (glm) con ajuste para una distribución de Poisson. Para el análisis del número de caídas donde se compararon los distintos perfiles dentro del lek se utilizó el modelo lineal generalizado mixto (glmm) con ajuste para una distribución de Poisson.

Análisis multivariado

Se empleó el paquete estadístico “*Multivariate Exploratory Data Analysis and Data Mining, FactoMineR*” disponible para R (Husson et al., 2014).

Capítulo 3.

Estudios complementarios de la transición adulto farado a adulto exarado.

3.1 Introducción

Como se mencionó en la introducción general, nuestro laboratorio ha realizado la datación horaria y precisa de los eventos que ocurren durante la metamorfosis de *C. capitata* (Boccaccio & Quesada-Allué, 1989; Pérez et al., 2018; Quesada-Allué, 1994; Rabossi et al., 1991; Rabossi et al., 1992). También ha analizado en detalle el proceso de pupariación (Wappner et al., 1996), la síntesis y deposición de proteínas cuticulares de la pupa y adulto farado (Boccaccio & Quesada-Allué, 1989; Rabossi et al., 1991), la degradación de tejidos larvales (Rabossi et al., 2000) y cambios en los niveles de moléculas de reserva durante esta etapa.

Llamativamente, a pesar de la gran cantidad de trabajos en *Drosophila melanogaster* y otros dípteros (Peabody et al., 2009; White & Ewer, 2014; Zdarek & Denlinger, 1992; Ždarek & Denlinger, 1987), en *C. capitata* se conoce muy poco sobre los sucesos macroscópicos y moleculares que ocurren durante las últimas horas del adulto farado y el adulto exarado que todavía no alcanzó la madurez reproductiva.

La morfología y las propiedades mecánicas (fragilidad y dureza) del pupario son esenciales para la emergencia normal del adulto (Denlinger & Zdarek, 1994). Con la emergencia del adulto y abandono de la exuvia pupal, que permanece unida al pupario, se inicia una nueva etapa en la vida de los dípteros, que comienza con la transición del adulto farado a adulto exarado, es decir la ecdisis del pupario (ver introducción general). Esta transición es particularmente sensible, su perturbación provoca alteraciones en la emergencia del adulto y posterior estado funcional del insecto en su vida adulta (Barry et al., 2003; Berni et al., 2003; Pujol-Lereis et al., 2010). Además, el adulto inmaduro es particularmente vulnerable a predadores, por lo tanto esta transición es crítica.

Nutrientes y sustancias energéticas

En los insectos holometábolos el mayor contenido de carbohidratos (mayoritariamente glucógeno y trehalosa) se registra al final del tercer estadio larval (Chippendale, 1978; Tolmasky et al., 2001). El proceso de metamorfosis está acompañado por un sustancial consumo de esas reservas de carbohidratos y lípidos.

En insectos, el glucógeno es muy abundante en cuerpo graso, intestino y músculos del vuelo, aunque existe almacenamiento en otros tejidos con excepción de la hemolinfa (Chippendale, 1978). Nuestro laboratorio fue pionero en estudiar el metabolismo del glucógeno durante la metamorfosis en insectos, demostrando que las reservas de glucógeno en músculo y cuerpo graso de las larvas se consumen prácticamente por completo al inicio de la pupariación. Posteriormente, durante el estadio pupal ocurre una síntesis *de novo* de glucógeno, que formarán parte de las reservas energéticas de la pupa y del adulto farado (Tolmasky et al., 2001).

Todos los movimientos de los insectos, tanto en larva como en adulto son de alto requerimiento energético. El metabolismo de los músculos asociados al movimiento son aeróbicos, donde los sustratos son completamente oxidados a CO₂ y agua, y por lo tanto no hay subproductos propios de un metabolismo anaeróbico (Candy, 1997). En los insectos los músculos emplean trehalosa como molécula energética de disponibilidad inmediata, generada por más de una fuente de energía (principalmente los monosacáridos aportados por la dieta y el glucógeno). La trehalosa es el azúcar circulante y de rápido consumo en hemolinfa (Arrese & Soulages, 2010; Tolmasky et al., 2001). La Figura 6 muestra las principales reacciones involucradas en la síntesis de trehalosa.

El almacenamiento y la movilización de las reservas de lípidos son también procesos metabólicos clave en insectos (Hahn & Denlinger, 2010). Estudios realizados en 50 especies de 5 órdenes de insectos demostraron que todos requerían de una fuente de ácidos grasos poli-insaturados en la dieta. Resulta importante destacar que los insectos son incapaces de sintetizar el núcleo de los esteroides y los obtienen de la dieta y de la flora simbiote (Nation, 2002). Los esteroides cumplen principalmente funciones múltiples, tanto estructurales como funcionales. Los ecdisteroides, en particular la ecdisona son los precursores de la hormona de la muda (20-OH-ecdisona). Los triacilglicéridos (TAG) son lípidos de almacenamiento, formados por una molécula de glicerol esterificada en sus tres grupos hidroxílicos por tres ácidos grasos. Estudios pioneros en *C. capitata* describen cambios en las principales clases de lípidos durante fases larvales y adultas (Madariaga, 1970; Quesada-Allué & Belocpitow, 1978). Más recientemente, se determinó que el contenido de lípidos totales oscila durante la vida

adulta *C. capitata*, lo que sugiere una regulación endógena para mantener el equilibrio energético (Nestel et al., 2005; Pujol-Lereis et al., 2012). Por otro lado, en mosquitos y otros insectos, los lípidos cuticulares se han correlacionado con la edad y la supervivencia (Hugo et al., 2006).

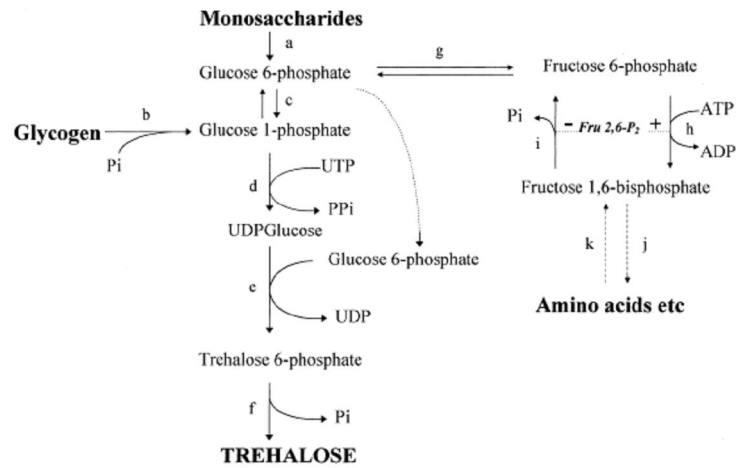


Figura 6. Síntesis de trehalosa y reacciones relacionadas en cuerpo graso de los insectos. Enzima/vía: (a) kinasas etc.; (b) glucógeno fosforilasa; (c) fosfoglucomutasa; (d) glucosa 1-fosfato uridil transferasa; (e) trehalosa 6-fosfatasa; (g) fosfoglucosaisomerasa; (h) fosfofructokinasa-1; (i) fructosa-1.6-bis-fosfatasa; (j) glucolisis; (k) gluconeogénesis. +/-, activador/inhibidos alostérico.

3.2 Hipótesis

Hipotetizamos que durante la metamorfosis se expresan, a partir de los discos imaginales y sistema nervioso, programas que en parte reflejan el estado fisiológico del insecto que es consecuencia de la historia de vida previa como larva. Por lo tanto, cuando se produce la última muda a adulto farado, el genoma de cada individuo expresará principalmente su micro-heterogeneidad genética modulada por el patrón epigenético heredado y el generado en la larva. Como en el pupario hay poca interacción con el ambiente, el éxito de la emergencia y demás comportamientos tempranos se basarían en dichos parámetros mencionados.

3.3 Objetivos

Con el objetivo de establecer en qué momento de su etapa joven una mosca macho adulta está preparada para iniciar la actividad de dispersión e interacción con otras moscas decidimos conocer el estado de la homeostasis metabólica durante la transición farado-exarado y primeros días del adulto exarado.

3.4 Materiales y métodos

3.4.1 Cuantificación de sustancias de reserva

Extracción y determinación de trehalosa

El dispositivo empleado para la extracción consistió en un tubo tipo Eppendorf® conteniendo un cristal de feniltiourea (PTU) en el fondo y una trampa construida con una seda de malla fina trabada con un trozo de puntera plástica de pipeta automática “p-1000” (Figura 7).

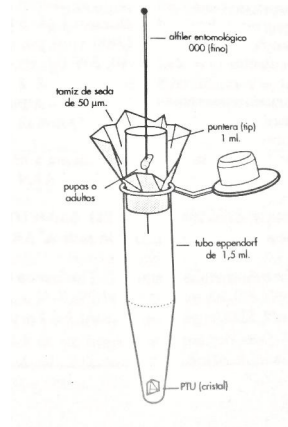


Figura 7: Dispositivo empleado para la extracción de hemolinfa libre de cuerpo graso. Figura tomada de Quesada-Allué (1994).

Para cada extracción se emplearon 5 insectos enteros. Fueron colocados sobre la trampa y directamente sobre ella son perforados de lado a dado con un alfiler entomológico. Rápidamente se centrifugó a 4000 rpm en ultracentrífuga refrigerada a 4°C durante 3 minutos. La hemolinfa fue colectada del fondo del tubo y rápidamente se procedió con la cuantificación. Para determinación de trehalosa se utilizó el kit comercial K-TREH (Megazyme, Ireland). Adaptamos los volúmenes propuestos por el fabricante a los volúmenes necesarios para medir la absorbancia en microplacas. Luego de 15 min de reacción se midió la absorbancia a 340 nm en un multidetector (Beckman Coulter, multimode detector DTX 880).

Determinación de glucógeno

Se utilizó el método de Krisman (1962) modificado según Tolmasky et al. (2001). Se realizaron homogenatos en KOH 33% a partir de moscas enteras. Se dejó digerir durante 15 min en placa caliente a 100°C. Luego se agregaron 3 volúmenes de etanol 96% para precipitar el glucógeno en solución. Se dejó precipitando toda la noche en la heladera a 4°C, y se centrifugó a 2000 x g en ultracentrífuga refrigerada a 4°C. El residuo sólido obtenido se resuspendió en 0,1 ml de agua destilada. Todas las muestras de glucógeno fueron determinadas por reacción de 100 µl de suspensión con 1,3 ml de reactivo I2/KI/CaCl₂ (según Krisman (1962)) y se midió la absorbancia en placa de 96 pocillos a 450 nm en un multidetector (Beckman Coulter, *multimode detector* DTX 880).

Los valores obtenidos se compararon con una curva patrón desde 0,175 mg/ml hasta 0,7 mg/ml, utilizando como estándar glucógeno (Sigma, type III Rabbit).

Determinación de lípidos totales.

La determinación de lípidos se realizó según Knight y colaboradores (1972), con leves modificación del método general de sulfo-fosfo-vainillina.

Se realizaron homogenatos a partir de moscas enteras o tejido disecado (ganglio cerebral, músculo torácico) en 200 μ l de Na_2SO_4 al 2%. Luego se centrifugaron los homogenatos a 2000 xg durante 5 minutos a 0°C para separar cutícula, restos no homogenizados y núcleos de la solución. Se descartó el sedimento y se tomaron 20 μ l de homogenato para cuantificación de proteínas por método de Bradford (ver sección 6.2); los 180 μ l restantes se resuspendieron en 1320 μ l de cloroformo: metanol (1:2) en el mismo tubo y luego de agitación fuerte se centrifugó a 8000 xg durante 10 minutos a 0°C. Se tomó 500 μ l de la solución y se secaron en placa caliente a 100°C.

Luego de secar los 500 μ l se resuspendió el residuo sólido en 300 μ l de H_2SO_4 , se agitó y se dejó oxidar 30 minutos en placa caliente a 100 °C. Transcurrido el tiempo se dejó enfriar a temperatura ambiente y se tomaron 30 μ l de solución que se colocaron en placa de 96 pocillos (placa *multiwell*), agregando luego 270 μ l de reactivo de vainillina. Luego de 30 min de reacción se midió la absorbancia en un multi-detector (Beckman Coulter, *multimode detector* DTX 880) a 510 nm. El resultado se correlacionó a una curva patrón de concentración creciente de un estándar de Trioleina (Sigma, 90% pureza).

3.4.2 Consumo de oxígeno

Armado del respirómetro y bases del funcionamiento

El equipo empleado fue construido en mi tesina de licenciatura (Bochicchio, 2012)(Figura 8). Consiste en un recipiente hermético con tapa a rosca (tubo Falcon® de 50 ml.) donde en la tapa lleva inserto una pipeta de 1 ml.

Un organismo aeróbico consume oxígeno y libera dióxido de carbono como uno de los productos metabólicos. Para poder registrar únicamente el oxígeno consumido es necesario quelar el dióxido liberado. En este caso se utilizó como agente quelante KOH

(15% p/v) humedecido en algodón. El dióxido combinado con el KOH precipita dando K_2CO_3 que queda retenido en el algodón. (Figura 8A).

Todos los tubos conteniendo las moscas son sumergidos en agua, dentro de un recipiente adiabático, debido a que es necesario mantener la temperatura constante. Es importante destacar la importancia de este paso, debido a que la temperatura no solo afecta la cinética metabólica de cada organismo sino también afecta la presión del gas dentro del respirómetro, según las leyes de los gases. (Figura 8B). A medida que el oxígeno es consumido por las moscas la presión dentro del respirómetro disminuye, permitiendo la entrada de agua por la pipeta. La cantidad de agua que ingresa por la pipeta es directamente proporcional al volumen de oxígeno consumido, transcurrido un determinado intervalo de tiempo.

Metodología empleada para el ensayo

Se tomaron muestras de 20 moscas al azar de -3; -1; 1 y 5 días de edad, contadas a partir del momento de la ecdisis del imago, por réplica. Las moscas fueron colectadas utilizando una aspiradora *ad-hoc* (descrita a continuación) y luego fueron anestesiadas en frío. Se realizó el muestreo sin reposición de las moscas. Cada muestra pertenecía a una población distinta, donde cada respirómetro correspondía a la unidad experimental. Cada tubo contenía las moscas seguido de un tapón de goma espuma que impedía a los animales tener contacto con el algodón cáustico que llevaba luego, además de permitir el flujo de gases (ver Figura 8A). Se realizaron 3 réplicas para cada edad, más un control negativo (respirómetro vacío).

Los tubos fueron sumergidos en el baño termostatzado a 25°C, luego se dejó estabilizar el sistema durante 10 minutos. Transcurrido el tiempo, se realizó la medición registrando el volumen de agua que ingresó a cada respirómetro en intervalos de 5 minutos durante 40 minutos de ensayo.

Los resultados se analizaron como tasa de consumo de oxígeno por mosca; es decir se calculó para cada respirómetro el cociente entre el volumen de agua que ingresó y el tiempo de ensayo, todo esto sobre el número total de moscas (20 moscas). Luego se realizó el promedio de todas las réplicas y se calculó el desvío estándar.

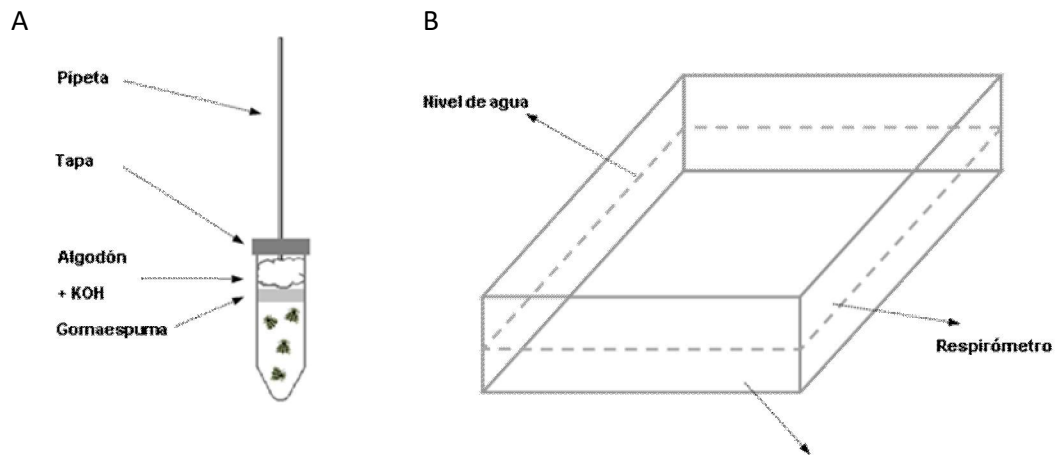


Figura 8. Esquema del equipo construido ad hoc. A. Respirómetro, B. Recipiente adiabático donde se sumergieron los respirómetros.

3.5 Resultados

Con el objetivo de determinar las variaciones en los niveles de las principales moléculas de reserva durante las últimas horas de adulto farado y los primeros 5 días de la etapa adulta, se cuantificó el contenido total de trehalosa, glucógeno y lípidos totales (principalmente triglicéridos). Se emplearon individuos enteros y su edad fisiológica se estableció según Rabossi et al. (1991).

3.5.1 Trehalosa

La Figura 9-A muestra que los niveles de trehalosa circulante en hemolinfa variaron significativamente para las edades analizadas ($p=0.013$). Durante la etapa adulto farado los niveles no se modificaron significativamente ($p>0.05$). Sin embargo, desde el día anterior a la emergencia del adulto los valores aumentaron significativamente, siendo el día de la emergencia un 44% mayor respecto al día -1 ($p=0.003$) y el día 1 (exarado) un 80% mayor respecto del día -1 (farado) ($p=0.015$). Por su parte, 5 días después de la emergencia, los niveles de trehalosa fueron similares a los registrados en el adulto exarado día 1. Durante la etapa exarada de 1 y 5 días, los niveles fueron más heterogéneos siendo el 5^{to} día el más disperso (D.E. 1días/D.E. -3días = 4.3; D.E. 5días/D.E. -3días = 6.1).

3.5.2 Glucógeno

La Figura 9-B muestra que los niveles de glucógeno variaron significativamente para las edades analizadas ($p < 0.001$). Durante la etapa adulto farado analizada los niveles no se modificaron significativamente ($p > 0.05$). Sin embargo, durante las últimas 24 h de este estadio (entre el día -1 y la emergencia del adulto) registramos una reducción del 60 % de su contenido total ($p < 0.001$). Posteriormente, luego de la emergencia el contenido de glucógeno se incrementó rápidamente y los niveles de glucógeno en moscas de día 1 fueron un 150% mayor respecto del día de la emergencia ($p = 0.007$), mientras que al día 5 estos aumentaron 500% ($p < 0.001$) (Figura 9-B).

Nuestros resultados indicarían que durante las últimas horas de adulto farado y la emergencia del adulto se consumirían la últimas reservas de glucógeno, con el concomitante incremento de los niveles de trehalosa circulante. Esta modificaciones estarían directamente relacionadas con la actividad que realiza el individuo para romper el opérculo del pupario, abandonar el mismo y lograr posicionarse en sus patas (ver Capítulo 2).

3.5.3 Lípidos totales

Se determinó que los niveles de lípidos totales (fundamentalmente triglicéridos) variaron significativamente, en forma similar al glucógeno, durante la transición farado-exarado ($p < 0.001$) (Figura 9-C). Durante la etapa adulto farado los niveles no se modificaron significativamente ($p = 0.78$), luego se observó un significativo descenso al momento de la emergencia ($p < 0.001$). Posteriormente, registramos un recomposición de los niveles de lípidos que aumentaron rápidamente a los 5 días de edad pos-emergencia logrando incrementar al doble las reservas ($p < 0.001$) (Figura 8-C). Como era de esperar el glucógeno y los triglicéridos contribuyeron al esfuerzo calórico y acumulación de trehalosa circulante en hemolinfa.

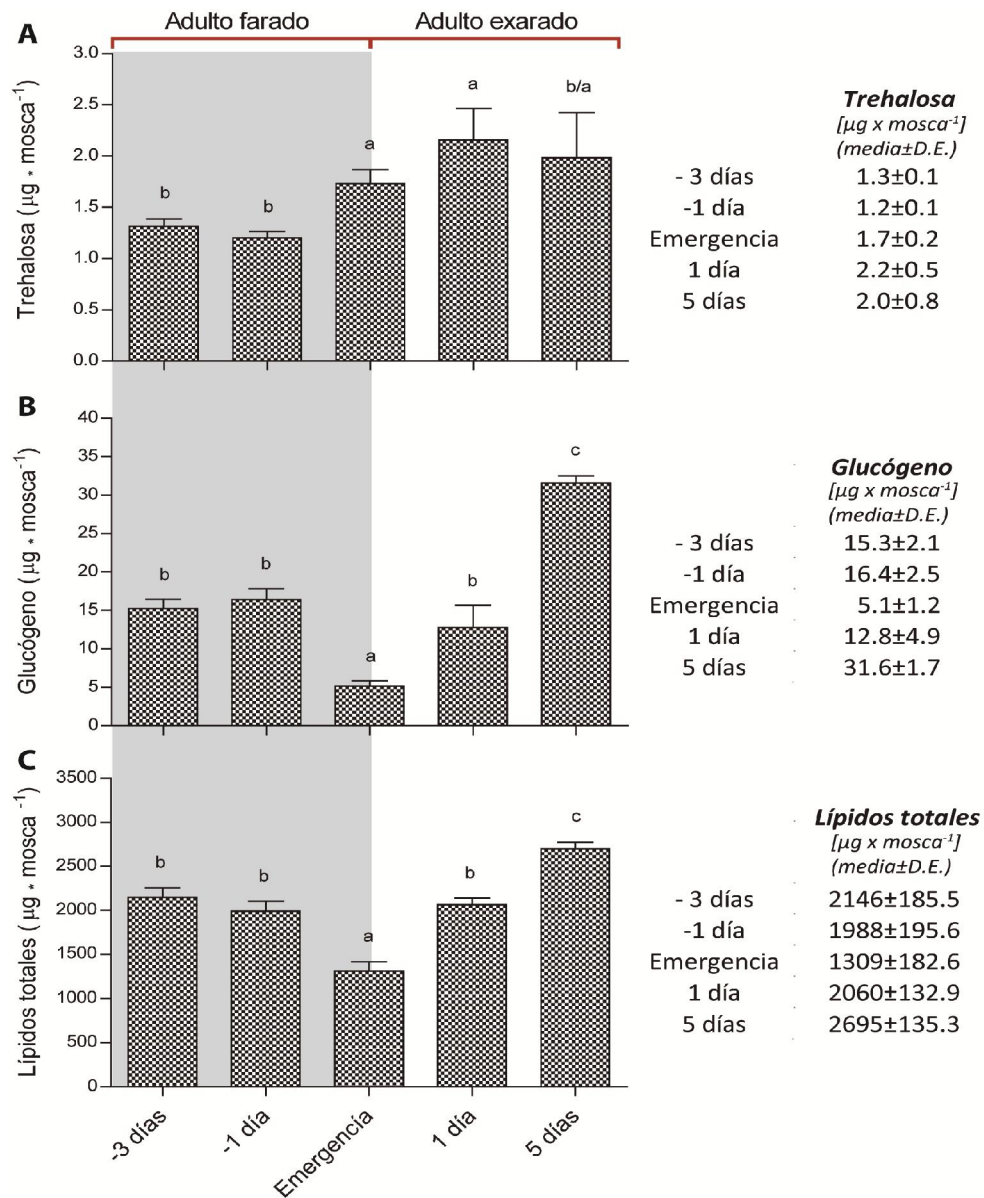


Figura 9. Estimación de los niveles de trehalosa (A), glucógeno (B) y lípidos totales (C), (principalmente triglicéridos) en mosca entera a distintas edades durante la transición adulto farado a adulto exarado. La tabla anexa indica los valores graficados. D.E. = desvío estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas entre las medias ($p < 0,05$).

3.5.4 Consumo de oxígeno

Determinamos el estado metabólico de poblaciones de machos aislados, a partir de la cuantificación del consumo promedio de oxígeno como medida metabólica indirecta (Figura 10 y tabla 1). El consumo de oxígeno en las etapas farado y exarado fue muy diferente ($p < 0.001$). El consumo de oxígeno aumentó significativamente desde el momento de la emergencia del adulto (en que la mosca se mueve libremente) (día 1) y la etapa farada (-1 día), registrándose un incremento del 237% ($p < 0,05$) (Figura 10). No se pudo estimar el consumo para el momento de la emergencia, ya que los tiempos necesarios en la técnica excedían al tiempo de emergencia que es solo de unos pocos minutos (Figura 10 y tabla 1).

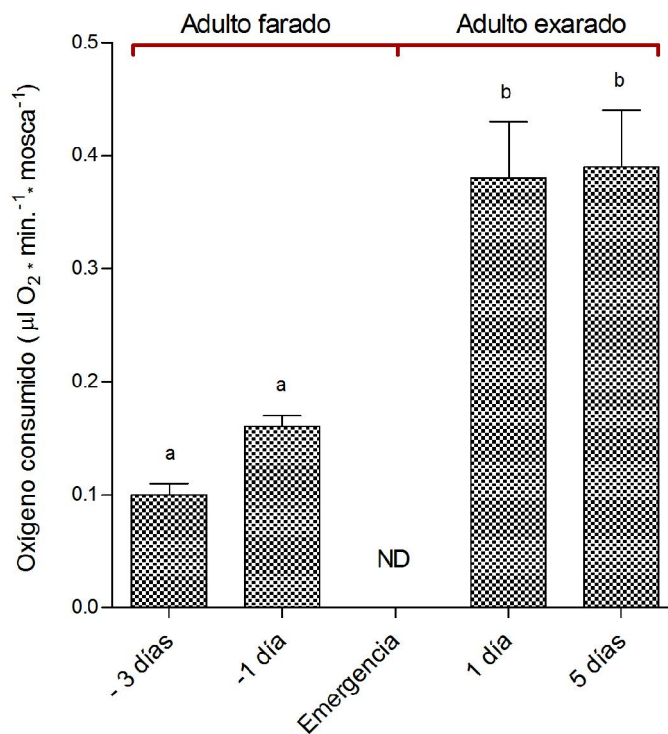


Figura 10 Consumo de oxígeno durante distintas etapas adultas de la mosca, medido a 23°C. Letras diferentes indican diferencias significativas entre las medias ($p < 0,05$). ND: no determinado.

Estadio Desarrollo	Edad (días)	N	Oxígeno consumido por población ($\mu\text{l}/\text{min} \pm \text{SD}$).	Oxígeno consumido por mosca ($\mu\text{l}/\text{min} \pm \text{SD}$).	Peso Población en respirómetro ($\text{g} \pm \text{SD}$).
♂ Adulto Farado	-3	3	$3,83 \pm 0,38$	$0,10 \pm 0,01$	$0,03 \pm 0,003$ (40 pupas)
	-1	3	$6,33 \pm 0,38$	$0,16 \pm 0,01$	$0,03 \pm 0,003$ (40 pupas)
♂ Adulto Exarado	1	3	$7,62 \pm 0,92$	$0,38 \pm 0,05$	$0,15 \pm 0,001$ (20 moscas)
	5	3	$7,90 \pm 1,20$	$0,39 \pm 0,05$	$0,19 \pm 0,01$ (20 moscas)

Tabla 1 Datos del consumo de oxígeno durante distintas etapas adultas de moscas macho aisladas, medido a 23°C, graficados en la Figura 9.

3.6 Conclusiones y discusión

Determinamos el contenido de sustancias de reserva durante la transición de adulto farado a exarado en *Ceratitis capitata*. Tal como se describió en trabajos anteriores del laboratorio la larva 3 es el último estadio para acumular reservas (Tolmasky et al., 2001). El glucógeno y los triglicéridos están principalmente acumulados en el cuerpo graso de la larva y una fracción de este tejido perdura en parte durante la metamorfosis, siendo la fuente de macromoléculas (Rabossi et al., 2004; 2008). Esto es crucial para el éxito de la metamorfosis, ya que la pupa en dípteros ciclorrafos es del tipo Coarctata, es decir está rodeada por la cutícula pupal y el pupario y por tanto no puede alimentarse.

Se estudiaron los perfiles de las sustancias de reserva, comparadas con el nivel de consumo de oxígeno. Como era de esperar el consumo de oxígeno del adulto farado fueron bajos y aumentaron hasta 4 veces luego de la emergencia (5to día vs -3 días). En estas edades la mosca exarada es móvil por lo cual también es esperable que su metabolismo general sea más alto.

La trehalosa se sintetiza en el cuerpo graso por la combinación de dos intermediarios de la glicólisis: glucosa-1-fosfato y glucosa-6-fosfato. Los niveles de trehalosa circulantes en hemolinfa tuvieron un perfil similar al del consumo de oxígeno. La trehalosa es el azúcar mayoritario y fuente energética inmediata circulante, por lo tanto, como es de esperar, las demandas energéticas en la transición adulto farado a exarado parecen estar cubiertas por este disacárido. El glucógeno que también se almacena en el cuerpo graso, entre otros órganos, es fuente de glucosa-1-fosfato para la síntesis de trehalosa mediante la glucógeno fosforilasa. El rápido descenso del glucógeno, registrado durante la transición de farado a exarado, estaría cubriendo la demanda de síntesis de trehalosa circulante (Figura 10 - A y B).

La reducción de los niveles de lípidos durante la transición adulto farado a exarado coincidió, al igual que la del glucógeno, con la desintegración casi completa del cuerpo graso reportada para los mismos tiempos por el Dr. Rabossi en su tesis doctoral (2001). En insectos, se estima que de la oxidación completa de carbohidratos se obtiene

4 kcal/g, mientras que de los ácidos grasos derivados del metabolismo de triglicéridos se obtiene más del doble de energía, alrededor de 9 kcal/g (Klowden, 2013). Entre el día -1 y el momento de la emergencia el glucógeno descendió en un 68.7%, mucho más rápido que los lípidos que fue de un 34.1%. Por lo tanto la semejanza en perfiles de consumo entre lípidos y glucógeno indica que, como era de esperar, ambas reservas se están metabolizando para cubrir la demanda energética requerida en la transición farado-exarado. Donde el alto rinde energético de los lípidos explicaría por qué su descenso durante la emergencia es menor que el registrado para el glucógeno. El aumento en los niveles de las tres moléculas de reserva registrado desde el día 1 coincidió con la ingesta de alimento del macho exarado.

El capítulo siguiente se concentrará en los estudios comportamentales observados durante la transición de la etapa de adulto farado a exarado; que involucra la rotura del opérculo, coloración, forma final del insecto adulto, y dispersión del adulto exarado.

Capítulo 4.

***Última etapa de la metamorfosis:
Transición de adulto farado a adulto
exarado.***

4.1 Introducción

4.1.1 Comportamiento de extricación

Reid *et al* (1987) introdujo el término “**extricación**” para describir la fase inicial del abandono del pupario, durante el cual el animal rompe con el *ptilinum* el opérculo del pupario e inicia una serie de movimientos tendientes a liberarse de este cascarón. La etapa de extricación finaliza cuando el animal logra posicionarse con sus seis patas sobre el suelo (Denlinger & Zdarek, 1994). La extricación consiste en dos patrones de comportamiento estereotipados: programa de movimientos de avance (*program for forward movement, PFM*) y programa de remoción de obstáculos (*program obstacle removal, POR*) (Zdarek & Denlinger, 1992; Zdarek *et al.*, 1986). El programa PFM consiste en repetidos movimientos musculares peristálticos del abdomen y tórax (Miyan, 1989; Reid *et al.*, 1987), esto permite que el cuerpo blando del adulto inmaduro se desplace hacia adelante. Cuando un obstáculo se interpone, por ejemplo el opérculo de pupario, el programa POR se enciende. Este es más complejo, ya que requiere ciclos de PFM pero con contracciones de mayor intensidad del tórax y abdomen. Como resultado el *ptilinum* se expande repetidas veces, hasta romper la cutícula por la línea de debilidad que lo demarca. El comportamiento de extricación persiste hasta que el animal abandona el pupario, para dar lugar al comportamiento de expansión del cuerpo.

4.1.2 Comportamiento de expansión

La expansión del cuerpo del adulto es un proceso temporal morfogenético distinto de la extricación, durante el cual el cuerpo se infla y las estructuras imaginales toman su forma final. El proceso se inicia con la reorientación de las patas, desde la posición característica dentro del pupario hasta la posición de caminata sobre las seis patas y la irreversible retracción del *ptilinum*. Luego, el adulto recién emergido (exarado) experimenta una serie de comportamientos: caminata, aseo, toma de aire o hinchado y contracciones abdominales, que culminan con adquisición de la forma final del cuerpo y extensión de las alas (Peabody *et al.*, 2009; Zdarek & Denlinger, 1992).

Las contracciones abdominales, junto con la bomba cibarial, producen un aumento de la presión hemocélica a partir del aire contenido en el intestino (Zdarek & Denlinger,

1992; Ždarek & Denlinger, 1987). Esta presión facilita la extensión de las alas, abdomen y otras partes del cuerpo. Luego de que se alcanza la forma final del cuerpo, la presión hemocélica decae, iniciándose el proceso de la esclerotización y adquisición de color de la cutícula.

4.2 *Objetivos*

Identificar los primeros eventos comportamentales durante y después de la emergencia, desde la extricación hasta el despliegue de las alas. Para estos estudios fue necesario construir aparatos *ad-hoc* ya que los comerciales no se ajustaron a las necesidades experimentales.

4.3 *Materiales y métodos*

4.3.1 *Diseño de sistemas de filmación de moscas*

Los estudios comportamentales presentes en este capítulo se centraron en etapas poco exploradas dentro del ciclo de vida de la mosca *C. capitata*, estas son la etapa el final de la metamorfosis, la emergencia del adulto y la etapa adulto joven. Para nuestros estudios fue necesario la datación precisa de horarios, como así también el registro de imágenes que nos permitieran analizar los comportamientos del insecto en cada ensayo, por lo tanto fue necesario la utilización un sistema de monitoreo con video cámaras. Si bien es amplia la disponibilidad de sistemas y equipos comerciales, no hemos encontrado ninguno que se ajustara a nuestra diversidad de experimentos. Por lo tanto, fue necesario crear un sistema experimental versátil, que nos permita imitar situaciones naturales controladas del insecto, interpretando de esta forma las observaciones en un contexto seminatural.

Construcción del escenario

Para realizar el video monitoreo de los insectos fue necesario contar con luz homogénea que permita obtener imágenes claras y con los insectos bien contrastados. El escenario se diseñó de forma cilíndrica, cuyos laterales, base y tapa estaban rodeados

con luz LED (Figura 11). La luz iluminaba a la arena experimental a través de un papel opaco, sostenido por un esqueleto de hierro de 6mm, obteniéndose así una iluminación difusa y homogénea.

Se eligió iluminación LED ya que es luz fría, es decir no irradia calor como las lámparas incandescente y no produce estroboscopia como las lámparas o tubos fluorescentes.

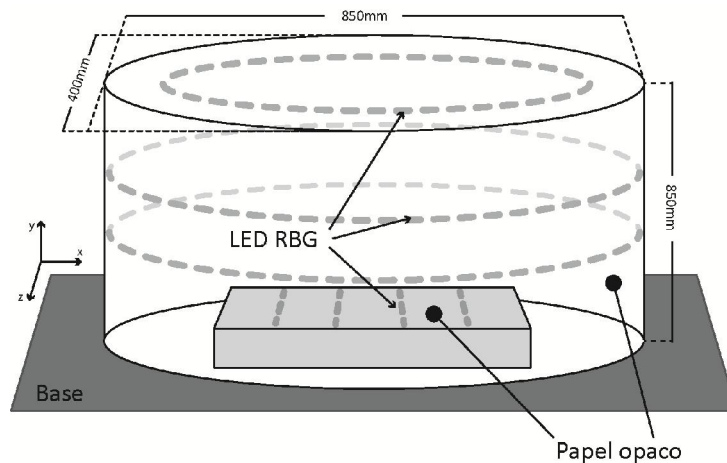


Figura 11. Esquema del escenario construido ad-hoc, se muestra las dimensiones y disposición de luces.

Controlador de luces

Se desarrolló un programa de computación *ad hoc*, con el objetivo de controlar las luces LED del escenario y mantener el fotoperíodo 16:8 h de luz y oscuridad de forma constante. El controlador es un dispositivo que permite encender y apagar la luz a un horario determinado en forma precisa. Cuenta en su interior con un microprocesador Arduino® que a partir del uso de su software de programación (Arduino Software®) se le puede asignar diferentes funciones, que en nuestro caso y en resumidas palabras, permitió controlar el flujo de corriente en un circuito impreso. El controlador se conectó a la computadora y con el uso de la interfaz gráfica que se muestra en la Figura 12 se pudo ajustar los horarios de luz deseada. Luego desde el controlador se conectó la luminaria. La iluminación y el controlador estaban alimentados con una fuente de 12volt de 500wats de potencia de corriente continua.

En nuestro diseño se pudieron controlar en forma independiente hasta tres fotoperíodos, es decir se podía trabajar hasta con tres horarios diferentes de luz-oscuridad.

Utilizamos la tecnología LED RGB, para ello el controlador nos permite elegir el canal de luz rojo (*Red*), verde (*Green*), azul (*Blue*), o la combinatoria que deseemos. Durante la fase de luz del fotoperíodo (o día subjetivo) la iluminación fue blanca (7000k-8000k) y con una intensidad de 2700 lúmenes. Sin embargo para poder video-monitorear los insectos durante la fase de oscuridad (o noche subjetiva) se utilizó la luz roja, con una longitud de onda de 620-630nm y con una intensidad de 2100 lúmenes.

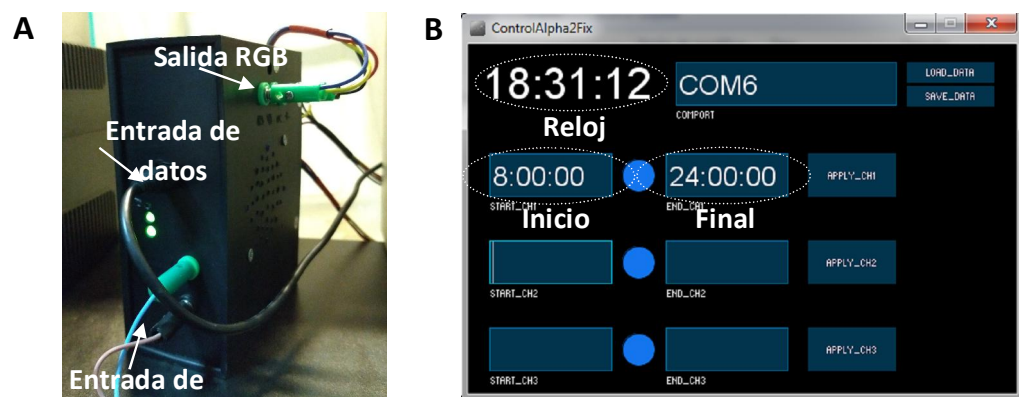


Figura 12: A – fotografía del controlador de luces construido *ad-hoc*,
B – interfaz del comando de luces.

4.3.2 Diseño del Sistema de captura de video *ad-hoc*.

Los insectos fueron filmados usando las videocámaras Logitech-C-625 (Logitech, Switzerland). Cada cámara estuvo dedicada a la captura de videos de una arena experimental. La captura de video fue programada por un software desarrollado también *ad-hoc*, al que llamamos *Fly-tracker Recorder*. Cada imagen de video contó con una resolución de 640x480 pixel a 30 cuadros por segundo con un foco constante. El software nos permitió encender las cámaras diariamente en forma automática según se deseara.

4.3.3 Análisis de trayectoria y actividad.

El movimiento de los insectos dentro de la arena experimental fue analizado usando un software experimental original, desarrollado en nuestro laboratorio llamado *Fly-*

tracker Analyze. El empleo de este programa nos permitió establecer la posición real de la mosca en el plano e interpretarlo en un sistema de ejes cartesiano por unidad de tiempo ($X_{(t)}$ e $Y_{(t)}$). Empíricamente, el movimiento del insecto fue definido con el criterio de velocidad, si el animal se movía a una velocidad de 1cm/min o mayor, se lo consideró en movimiento. Velocidades menores se lo consideró en pausa o estático.

El Fly-tracker fue escrito en el lenguaje de programación C++, empleando las librerías de uso libre de *Open Source Computer Vision Library* (OpenCV®, <http://opencv.org>), *Open Computing Language* (OpenCL™, <http://khronos.org/opencv>).

El método de detección tiene, en principio, los mismos pasos lógicos descritos por Branson et al. (2009) que alterna dos eventos: detección de la mosca y asignación de la identidad de la mosca (Figura 13). Para ello en cada cuadro de video, el insecto es detectado como un promedio de píxeles y su posición computada (x,y). Luego, la mosca en un cuadro a un tiempo t_n fue asociada con la misma mosca que fue identificada previamente en el cuadro anterior a tiempo t_{n-1} . A esto lo llamamos criterio del animal más cercano. Nuestro método innova al agregar al inicio del análisis, un cuadro de imagen como fondo y otro como máscara, de esta forma nos permitió eliminar objetos que no son del interés de análisis, como ser basura o componentes de la arena.

El desplazamiento de cada insecto fue estimado empleando la ecuación vectorial (1). Los datos de la posición ($X_{(t)}$ e $Y_{(t)}$) de cada mosca fueron recopilados en un archivo de valores separados por comas (.CSV) y analizados utilizando el programa Excel (Microsoft).

$$(1) \quad \Delta r_n = \Delta X_{n(t)} i - \Delta Y_{n(t)} j$$

$$\text{Donde:} \quad \Delta X_n = X_n(t_n) - X_{n-1}(t_{n-1})$$

$$\Delta Y_n = Y_n(t_n) - Y_{n-1}(t_{n-1})$$

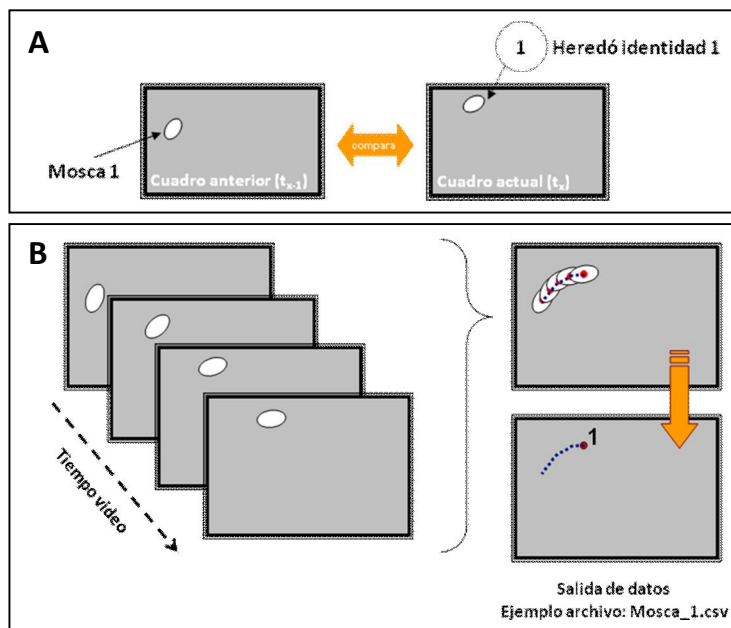


Figura 13: Esquema de los principales eventos para el análisis de trayectoria y actividad del software ad-hoc fly-tracker. A- Identificación de la mosca por criterio del animal más cercano, B – Detección de movimiento y recopilación de eventos.

4.3.4 Arena experimental

Se probaron diversos métodos de filmación. Finalmente, se arribó al diseño de arena óptimo para nuestros propósitos, que se reporta en la sección de resultados por no haber existido previamente en el laboratorio. Se utilizaron placas de Petri de acrílico de 35 mm de diámetro. Se colocaron 12 placas en total sobre la base del escenario (Figura 14). Cada placa contenía en su interior un adulto farado de -1 día de emergencia, que fue ubicado en el centro junto con una gota de alimento que cumplió también la función de anclaje. El alimento estaba compuesto por 2 gramos de azúcar:levadura (3:1), en 100 ml de agar-agar 1%. Una vez preparada la solución, se dejó enfriar y previo a gelificarse se colocó 100ul de alimento sobre la base de la placa y se pegó el adulto farado con la precaución de dejar la porción anterior descubierta (Figura 15A). Sólo se consideraron los datos obtenidos para adultos macho, se descartaron los de hembras, ya que los estudios siguientes de esta tesis se concentraron en machos.

Para determinar el tiempo que demora desde la emergencia el adulto hasta el primer evento de alimentación, se tomó como parámetro fijo un área de 10x10 mm ubicada

justo en el centro de la placa que contenía a la gota de alimento. Si el animal se posicionó en esa zona por un tiempo mayor o igual a 2 segundos se lo consideró como evento de alimentación, el chequeo del evento del dato de posición se hizo manualmente observando la extensión reitera de la probóscide (Figura14A).

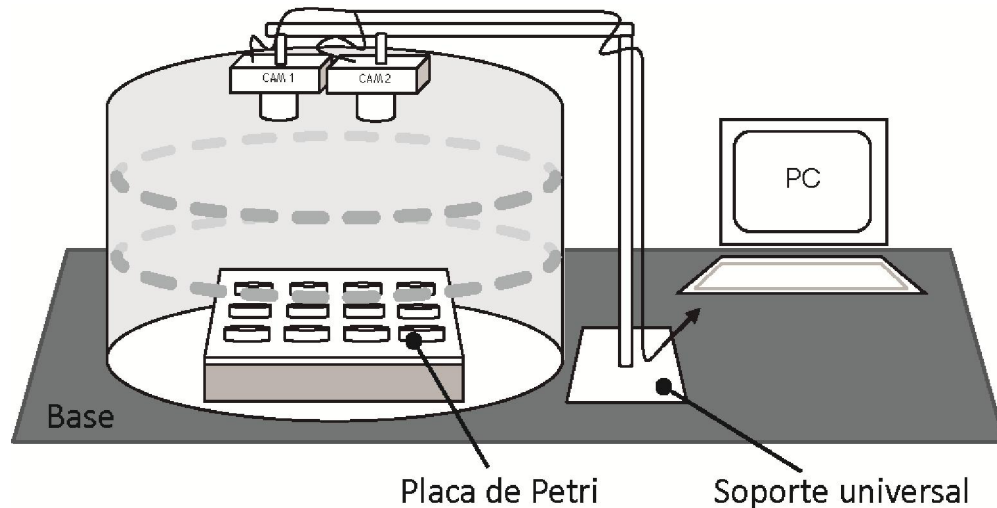


Figura 14 Diagrama del dispositivo experimental. Se muestra la distribución de las placas de Petri y ubicación de las cámaras de video en el escenario de filmación.

4.3.5 Método de filmación

Se emplearon dos cámaras de video, cada una permitió monitorear simultáneamente a las 12 arenas, pero se encendían y apagaban en forma opuesta. Una cámara se configuró de forma tal de capturar videos durante la noche subjetiva, mientras la otra cámara se encendió durante el día subjetivo. El fotoperíodo fue de 16:8 (luz: oscuridad) el mismo que el de cría y manejo de adultos en el laboratorio. La Figura 15B muestra el esquema de horarios de encendido y apagado de luces y cámaras.

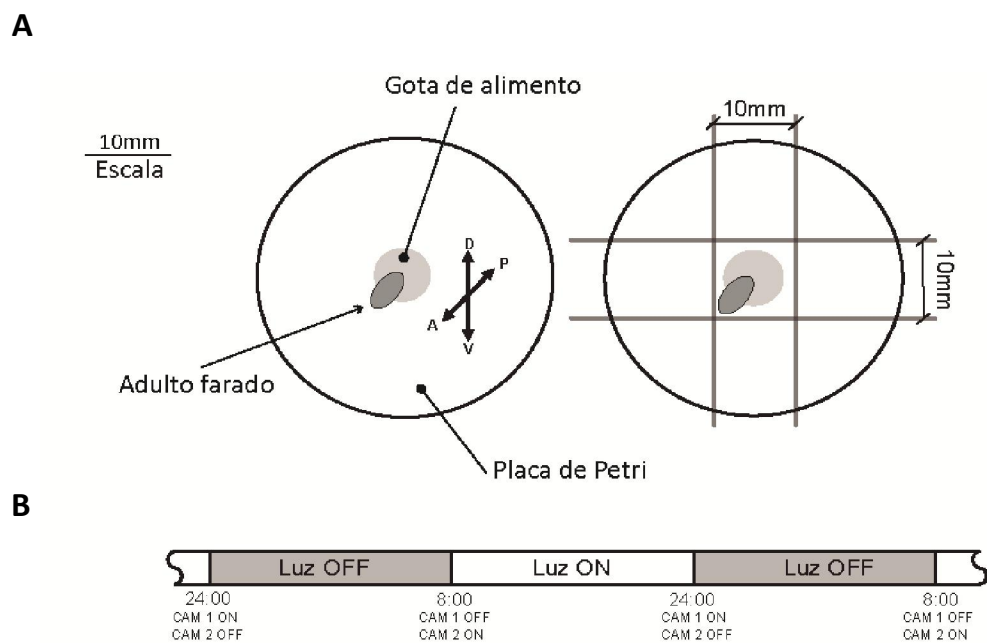


Figura 15: A. Esquema de la disposición del animal en la arena experimental (placa de Petri).
B. Esquema del encendido y apagado de luces y cámaras utilizado en el experimento.

4.3.6 Ensayo de reacción *in vitro* de la actividad NBAD-sintetasa

La síntesis de N- β -alanildopamina (NBAD) se estudió según lo descrito por (Perez et al., 2004).

4.4 Resultados

4.4.1 Abandono del pupario, expansión y forma final del adulto de *C. capitata*.

Extricación y emergencia.

El comportamiento de extricación representa la transición desde el final de la etapa de adulto farado hasta el inicio de la etapa de adulto exarado. Aunque existe una batería de hormonas que controlan eventos comportamentales (musculares) previos a la extricación, a los efectos de esta tesis consideramos que el comportamiento de extricación se inicia cuando el adulto farado rompe el opérculo del pupario y termina cuando el insecto abandona completamente el pupario y se para en sus seis patas (Figura 16). El análisis de distribución de frecuencias de emergencia ajustó a una distribución Gaussiana ($R^2=0,9$), donde la emergencia dió comienzo con la extricación del pupario. Los machos presentaron el mayor número de emergencia alrededor de las 12 hs. del mediodía (12.4 ± 0.2 hs.), 4 horas después de que se encendió la luz (ZT 4) (Figura 17). Sin embargo en la Figura 16 se pueden observar dos picos, el primer ascenso fue entre las 9 - 10 y 11 hs, siendo a las 11 hs el primer valor máximo (ZT 3). Luego el segundo pico fue a las 13hs (ZT 5) seguido de un descenso hasta los valores mínimos registrados a las 18hs.

El comportamiento de extricación de *C. capitata* presentó una duración promedio de 2.07 ± 0.96 minutos. La Figura 16 muestra, a modo de ejemplo, un fotograma de los principales eventos registrados en una de las placas analizadas. En la imagen se puede observar la rotura y apertura del opérculo por la expansión del ptilinum (Figura 16, intervalo 3 y 9 segundos), 9 segundos más tarde (tiempo de video 0:01:14) se observa como el insecto continua con la expansión pulsátil del ptilinum junto con las contracciones musculares longitudinales, proyectando la región anterior del cuerpo a través la sutura ecdisial de la exuvia pupal. En el fotograma siguiente (0:01:26) se observa que libera el primer par de patas, seguido por el segundo par y es recién ahí cuando las patas tocan la arena y traccionan, para luego alcanzar el desembarazamiento completo del pupario (0:01:29). Inmediatamente tras el abandono de la exuvia el

ptilinum dejó de expandirse y las contracciones longitudinales terminaron (ver video anexo complementario de la Figura 16).

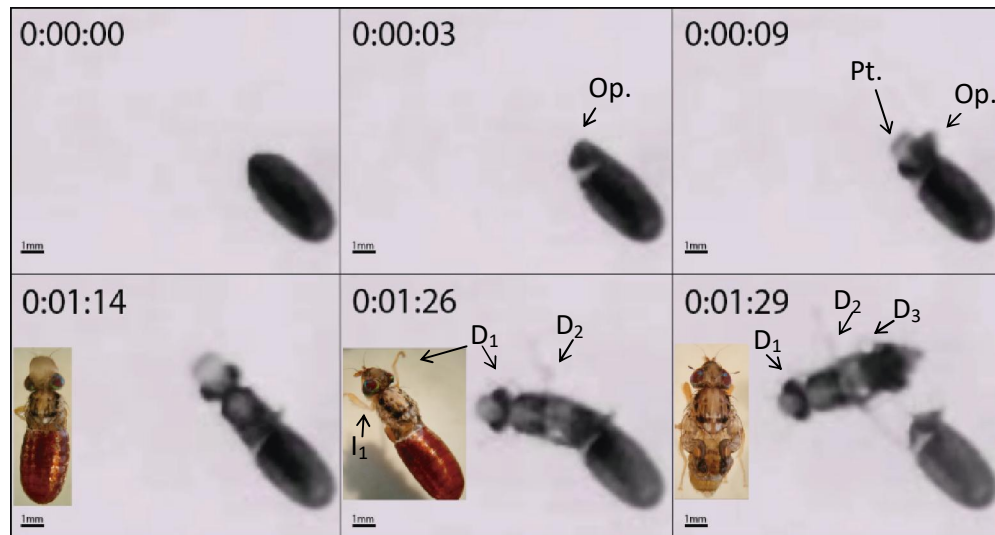


Figura 16. Fotograma que muestra los principales eventos registrados en el video de una arena experimental. Se muestran los sucesos que van desde la rotura del opérculo hasta el abandono del pupario. Las fotos en los recuadros muestran el detalle bajo lupa de la forma y color del adulto para los eventos que se muestran en el fotograma. Cada pata fue etiquetada según el lado Derecho (D) o Izquierdo (I) del cuerpo y el par de patas pertenecientes al protorax (1), mesotorax (2) o metatorax (3). Op.: Opérculo. Pt.: Ptilinum.

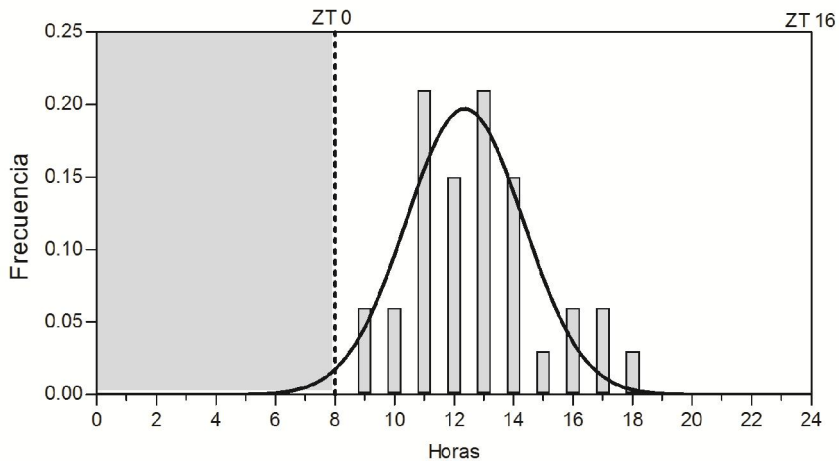


Figura 17. Frecuencias de emergencias del pupario de moscas *C. capitata*. La zona gris muestra los horarios de noche subjetiva, los blancos los de día subjetivo. La línea continua muestra el ajuste a una regresión no lineal ($R = 0.87$, media 12.4 ± 0.2).

Comportamiento inicial del adulto exarado

Con nuestro sistema de filmación fuimos capaces de seguir y cuantificar la trayectoria del insecto, estimar el tiempo en cada posición y por lo tanto la velocidad media con la que desplazó.

Hemos llamado **período de expansión de alas (PEA)** al período de tiempo que transcurre desde que el animal abandona el pupario hasta que logra extender las alas y comienza a caminar teniendo una duración promedio de 105.3 ± 25.4 min. La Figura 18 resume en una línea de tiempo los principales comportamientos mencionados durante la transición adulto farado a exarado y señala los eventos comportamentales que serán detallados a continuación. Las fotografías de la Figura 18 ilustran los principales eventos macroscópicos observados, característicos de cada etapa analizada.

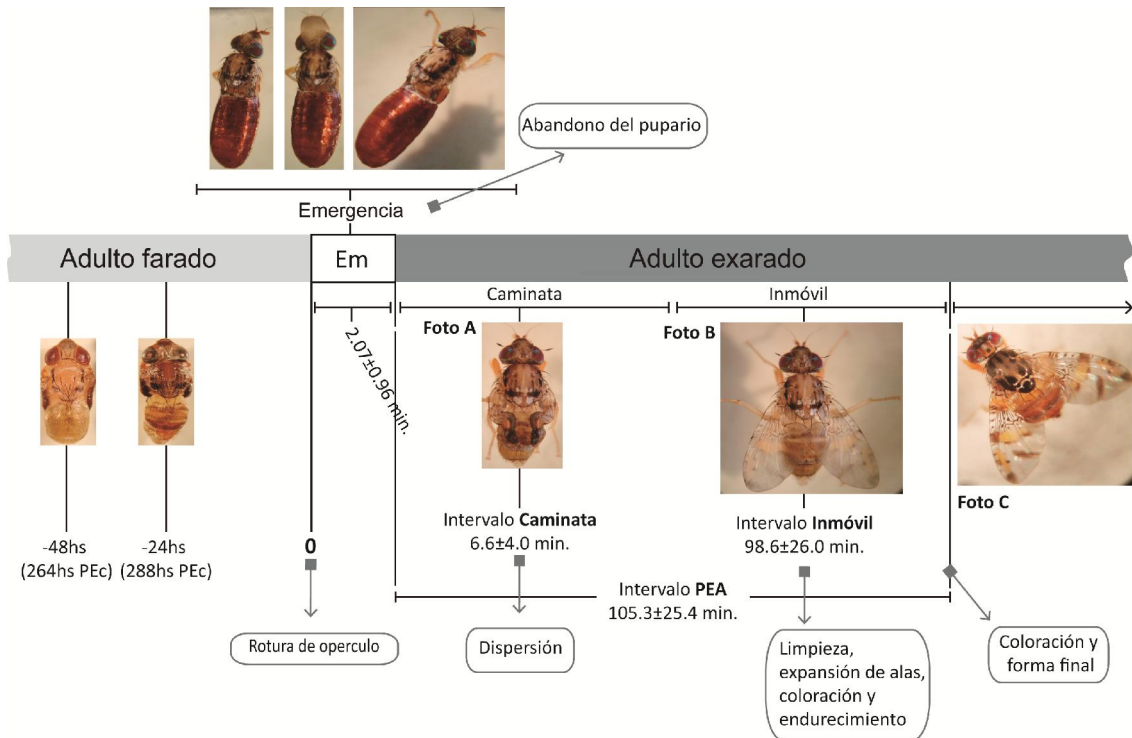


Figura 18. Resumen de los principales eventos descritos durante la transición adulto farado a adulto exarado. Los recuadros grises muestran las principales observaciones. Las fotografías A, B y C son ilustrativas de los principales cambios macroscópicos observados. Las imágenes tienen un aumento de 4x.

Descripción de comportamientos durante el PEA

En todos los casos, el adulto recién emergido presentó el cuerpo alargado y las alas plegadas sobre el dorso (Figura 18, Foto A). Determinamos que, apenas emergido, inicia un período de “**Caminata**” (**C**) que duró en promedio 6.6 ± 4.0 min hasta que se detuvo. En la Figura 19 se observa un ejemplo típico: el insecto durante el período **C** es muy activo, alcanzando una velocidad máxima de 252.2 cm/min. Sobre un total de 34 animales analizados, durante el período **C** se observó que en el 80 % de los casos no hubo pausas o detenciones durante la caminata, en el 16 % solo lo hizo una vez y el 4% restante se detuvo dos o más veces. Durante este período, las moscas recorrieron una distancia promedio de 150.3 ± 13.5 cm, equivalente a 300 veces el largo de su cuerpo. La Figura 20-A muestra un ejemplo representativo del patrón de actividad de una mosca. En el recuadro B (gráfico de burbujas) se muestra que el insecto desde que emerge no se detiene hasta ubicarse, en este caso, en el borde superior derecho del gráfico.

Al final de la etapa de caminata, las moscas comienzan a limpiarse la cabeza y parte anterior del cuerpo con sus patas delanteras. Luego de la limpieza, el individuo pierde movilidad (se da por finalizado el período **C**) e inicia la “**etapa inmóvil**” (**I**). Durante esta etapa, se observó que el animal se hincha y se contrae a su tamaño normal en forma pulsátil, tanto en el eje anteroposterior como también hacia los laterales (principalmente en el abdomen). Estas pulsaciones son de intervalos cada vez más largos hasta que culminan con la extensión gradual de las alas (Figura 18, Foto B). Cabe reiterar que durante todo este evento, el animal estuvo posicionado en un mismo sitio de la arena, donde ocasionalmente se observó algún giro. La etapa **I** de *Ceratitis capitata* duró en promedio 98.6 ± 26.0 min y durante la misma pudimos definir dos eventos muy importantes. El primero, como se detalló anteriormente, fue el de extensión de alas y duró en promedio 11.1 ± 4.3 min. Este evento finaliza cuando las alas se extienden sobre el abdomen y la mosca mueve sus patas traseras para limpiar o alisar las alas. El segundo evento importante es la coloración progresiva de la cutícula del cuerpo en general y de las venas de las alas en particular que conlleva la expansión definitiva de las alas para lograr el aspecto característico de las alas de esta especie en forma de flecha (Figura 17, Foto C), este último evento duró en promedio 95.1 ± 31.2 min.

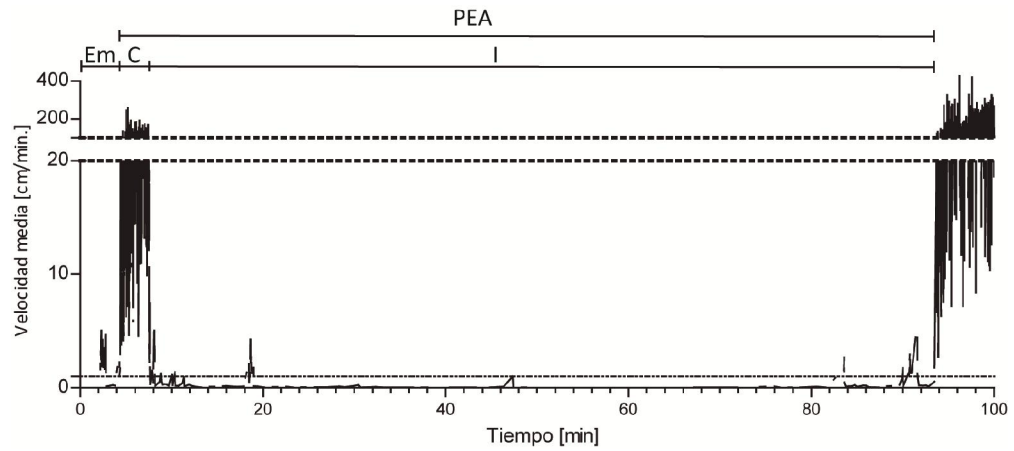


Figura 19. Gráfico de velocidad media de desplazamiento de una mosca en función del tiempo desde que inicia la emergencia hasta que estira las alas. Se identificaron dos intervalos: Emergencia (Em) y el Período de Extensión de Alas (PEA). El intervalo PEA se desdobra en Caminata (C) e Inmóvil (I).

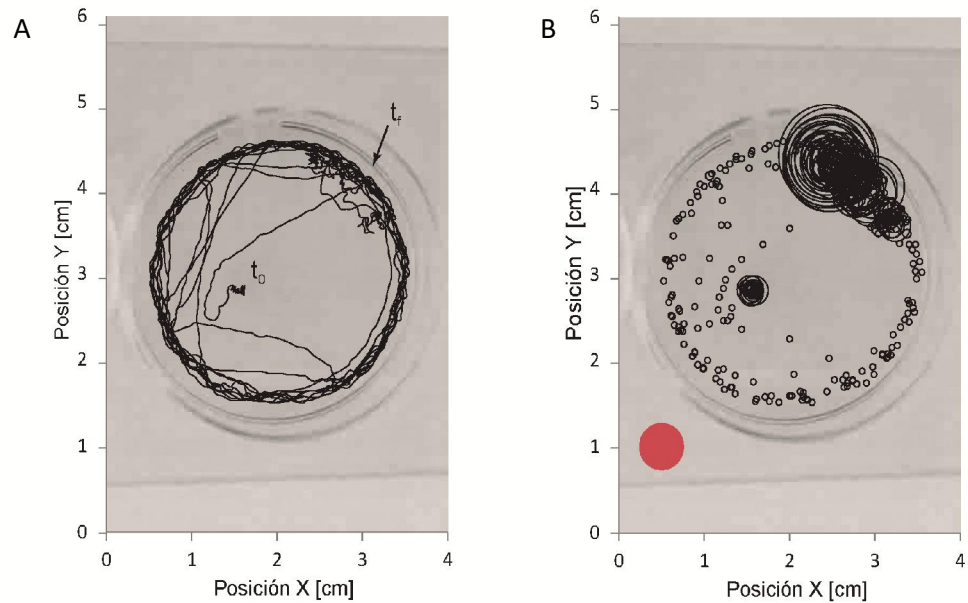


Figura 20. A. Gráfico cartesiano que muestra la trayectoria de una mosca desde que abandonó el pupario hasta el momento en el que se detuvo y comenzó a expandir las alas. **B.** Gráfico de burbujas que muestra el tiempo de detención para cada punto de la trayectoria graficada en A; a mayor tiempo de detención mayor diámetro. El círculo rojo indica la referencia de relación diámetro/tiempo. Ver: [video_suplementario_Figura20](#)

La mosca fue capaz de volar luego transcurridos 178.0 ± 3.6 min desde que el animal abandona el pupario, es decir aproximadamente 70 minutos más tarde de finalizado el **PEA**. Interesantemente, las moscas nunca se acercaron al alimento disponible hasta completado el **PEA**, sino que comenzaron a alimentarse en promedio a los 112.1 ± 22.8 minutos y el meconio se observó a los 120.7 ± 29.8 minutos desde la mosca abandona el pupario. Por lo tanto las deposiciones se observaron aproximadamente 10 minutos más tarde de la primera ingesta.

4.4.2 Esclerotización y tanificación de las alas del nuevo adulto

Simultáneamente con la expansión de las alas se inicia el proceso de su esclerotización para adquirir la forma definitiva, estabilizar la cutícula e iniciar el proceso de proceso de tanificación pre-programada, con la adquisición de color.

Las alas recién desplegadas mostraron un color gris pálido opaco (Figura 21, 30min) y se mantuvieron grises en las zonas donde no se localizaron las futuras machas marrones o negras (Figura 21, 72hs en adelante). Las alas del insecto maduro muestran un patrón de manchas marrones y negras, sobre un fondo gris pálido (o *silver paint*) característicos en esta especie (Figura 21). Las manchas se observaron muy tenues desde los 30 min. Sin embargo las manchas negras melánicas lograron su intensidad definitiva a las 48hs, mientras que las marrones a las 72hs. Durante el transcurso de esta tesis colaboramos con los Doctores Pérez y Rabossi en la resolución, por primera vez, del problema de cómo se definen las típicas manchas marrones de la mosca mediterránea, ver Pérez et al. (2018).



Figura 21. Cronología de eventos de coloración de alas de mosca macho de *Ceratitidis capitata*. Tomado de Pérez et al. (2018)

Las células epidérmicas de la lámina de las alas desaparecen completamente luego de 2 hs post emergencia.

Comprobamos que las células epidérmicas de la lámina de las alas de *C. capitata* mueren rápidamente luego de la extensión de las alas (Figura 22). A partir de los primeros 30 min post emergencia, un gran número de células desaparecen y luego de 1h prácticamente no hubo registro de células vivas (Figuras 22 A y B). Como era de esperar, las proteínas solubles, extraíbles y atribuibles a la presencia de células de alas, decayeron en coincidencia con la desaparición de las mismas (Figura 22 B y C). Esto demostró por primera vez que el desarrollo de la coloración marrón ocurrió en ausencias de células epiteliales.

La coloración temprana de los pelos genera las manchas marrones de las alas.

Al analizar en detalle el progreso de definición de las manchas marrones y negras, bajo microscopio óptico, observamos que durante las primeras horas luego de la expansión de las alas la lámina no estaba teñida, sino que permaneció grisácea. Sorpresivamente, hemos podido comprobar que solamente los pelos alares pertenecientes a esa región eran los que se coloreaban, dando el color característico a la respectiva mancha (Figura 23-B). Se observó que la coloración de los pelos pertenecientes a las manchas marrones (“*Brown spots*”) continuaba en su base, delimitando una pequeña región o “botón” también de color marrón (Figura 23-B). Lo mismo se observó para las manchas negras o “*Black spots*” (Figura 23-B). Por lo tanto el color de la mancha no estaba determinado solamente por el color del pelo sino también por un área alrededor de su base o “botón”. Por otro lado, las regiones sin manchas (“*Grey lamina*”) presentaron pelos de color negro pero sin que la lámina este coloreada (Figura 23-B,).

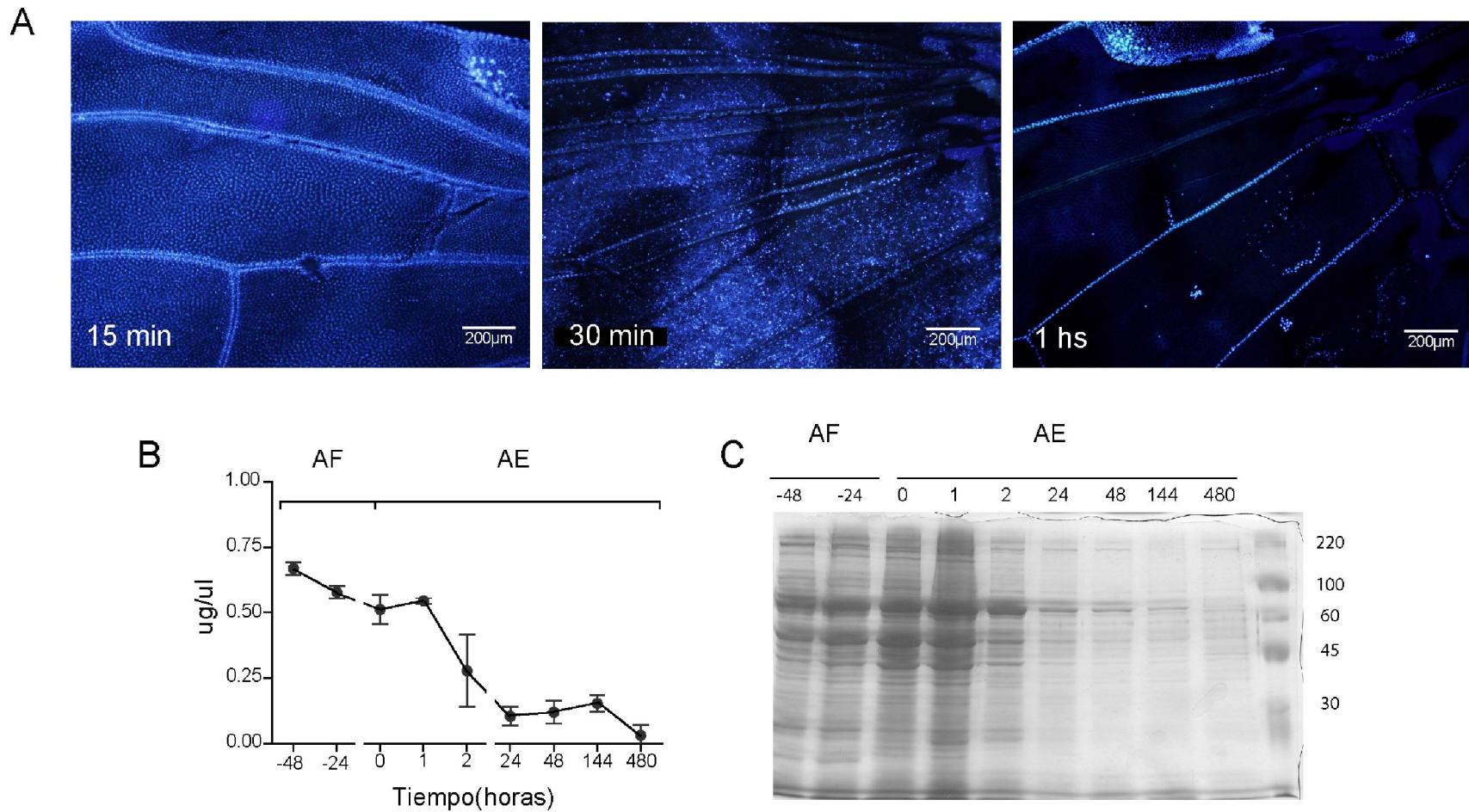


Figura 22. Las células epiteliales de la lámina de las alas desaparecen rápidamente luego de la extensión de las alas. A – Fotografías de tinción de núcleos con DAPI, se muestra la reducción del número de células en la lámina desde los 15 min hasta 1 hora de edad. B – Extracción de proteína soluble y cuantificación de alas desde adulto farado (AF, -48hs - ecdisis) hasta +480 hs. adulto exarado. C –Perfil de proteico de extractos hidrosolubles de alas en gel 10% SDS-PAGE.

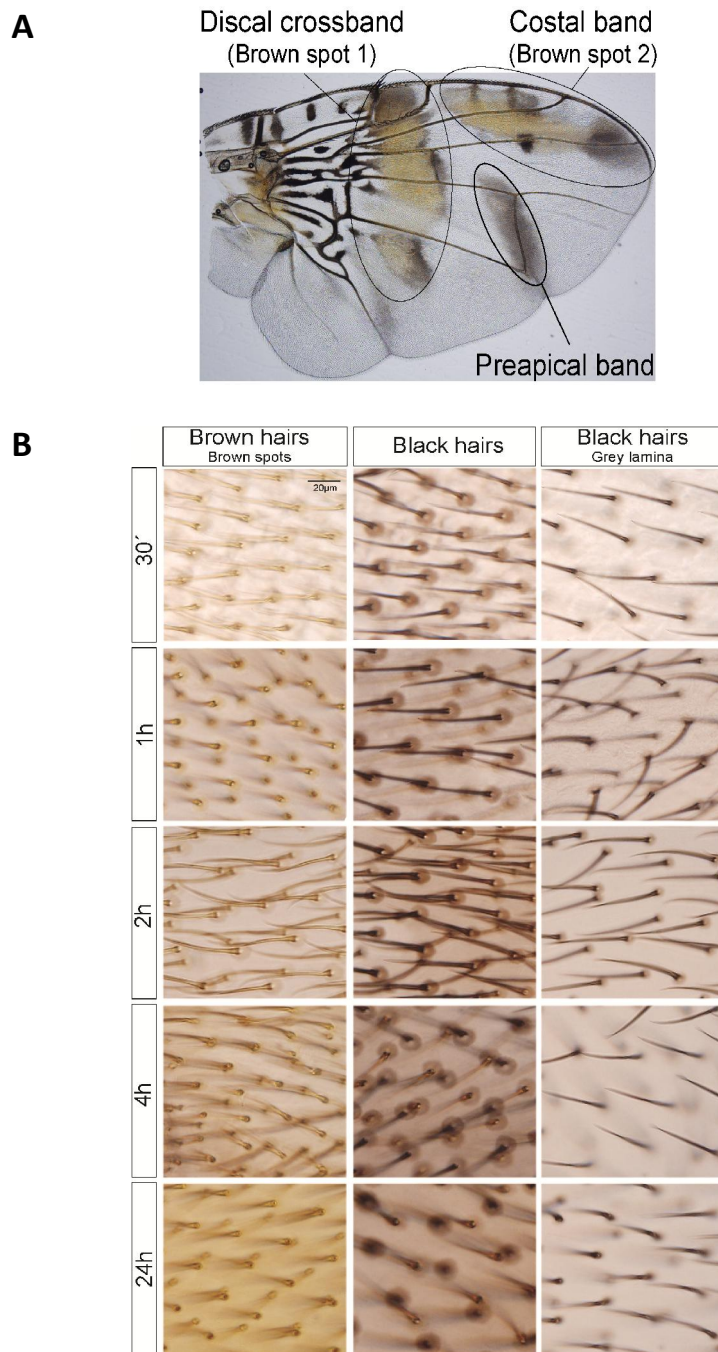


Figura 23. A- La imagen muestra un ala 24hs de edad de *C. capitata*, se nombran las tres principales manchas características de la especie. Tomado de Pérez et al. (2018). **B-** La imagen muestra la intensidad progresiva de la coloración de los pelos de alas de *Ceratitit capitata* desde los 30 min hasta las 24hs de edad pos emergencia para tres zonas diferentes: manchas marrones (brown spots), manchas negras (black spots), lamina gris (grey lamina). Aumento 100x. Publicado en Pérez et al. (2018).

Las manchas marrones son coloreadas gradualmente desde las venas hacia la lámina.

La Figura 24-A muestra el sentido de circulación de hemolinfa por las venas de las alas de *C. capitata*. Se eligió para esta parte del estudio la región marrón perteneciente a la macha llamada “*discal crossband*” debido a su rápida identificación y por estar atravesada por venas fácilmente visibles (Pérez et al., 2018)(Figura 24). Observamos que la coloración de la mancha fue gradual desde las venas hacia el interior de la lámina. Esto fue más notable en la zona limitada por las venas R_{2+3} con R_{4+5} y R_{4+5} con M (ver Figura 24). Sorpresivamente, aún en alas avanzadas de 24hs de edad, se observó una franja de cutícula contigua a las venas sin colorear, paralela a las venas R_{4+5} y M (Figura 24-B, 24hs. flecha maciza). Transcurridas 4 hs la mancha marrón fue fácilmente visible y a las 24hs la coloración ya estaba casi completamente terminada. Al mismo tiempo se observó que la mancha negra vecina coincidió temporalmente en su coloración.

Estudios del rol de la NBAD en la coloración de las manchas marrones

La hemolinfa juega un papel crucial en la extensión de las alas. Luego de la emergencia y período de caminata, las alas se extienden por el incremento de la presión de la hemolinfa circulante producto del accionar de los músculos abdominales. Nuestro laboratorio fue pionero en medir la actividad NBAD-sintetasa, demostrando que la síntesis de NBAD es el principal precursor del color marrón del pupario y de la cutícula del cuerpo de *C. capitata* (Wappner et al., 1996).

Por lo tanto, a partir de estos antecedentes, en la zona de futuras manchas alares debería estar presente dicha enzima responsable de la síntesis de NBAD. Pero nos encontramos con una paradoja, ya que, como hemos determinado, en esta etapa de coloración ya no existen células. Entonces debíamos demostrar si los sustratos para esta reacción eran provistos a través de la hemolinfa o si la hemolinfa transportaba la enzima y los sustratos estaban presentes en la cutícula.

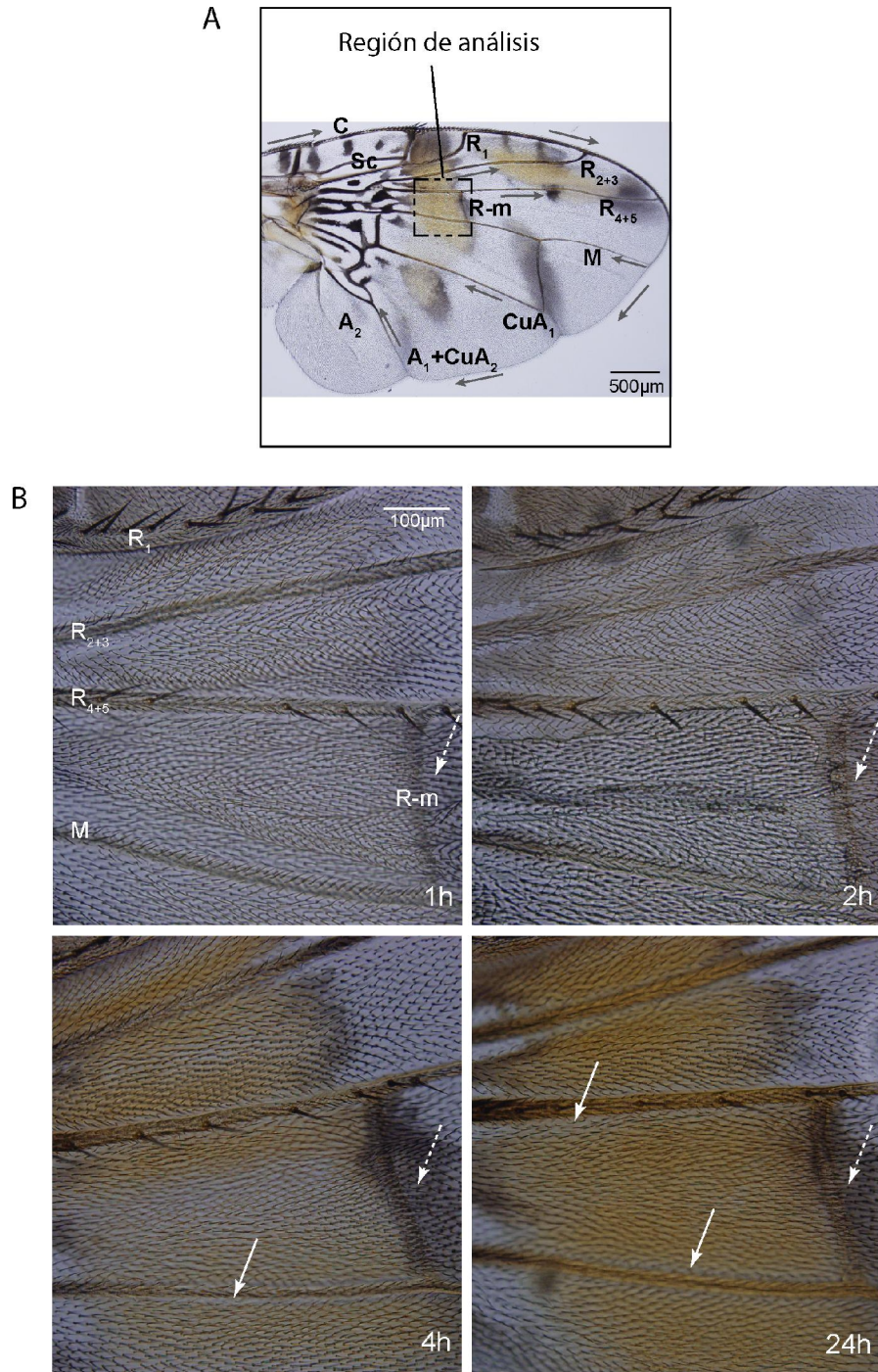


Figura 24. A- diagrama de circulación de hemolinfa en las venas de las alas. El recuadro punteado indica la región de análisis para ítem B (zona discal crossband). B- Progresión de la coloración marrón, se muestra como la coloración ocurrió gradualmente desde las venas hacia la lámina. La flecha punteada muestra la progresión de la coloración de la mancha negra vecina. La flecha maciza muestra la región contigua a la vena sin colorear. Las letras indican el nombre de las venas de las alas: C = costa, Sc = subcosta, R = radial, Cu = cubital, M = media, A = axilar. Tomado de Pérez et al. (2018).

En estudios iniciales nos propusimos investigar si el impedimento del flujo de hemolinfa por las alas producía una inhibición de la coloración marrón en estas (Figura 24). Para ello se tomaron animales de 15 min de edad y se obturaron las venas del ala derecha mediante presión (Figura 25-A) dejando intactas las del ala izquierda (control interno de tanificación, Figura 25-B). La obturación se logró presionando firmemente con un ansa la región proximal del ala, cerca de su axila. Transcurrido un intervalo de 3 horas el ala derecha resultó escasamente pigmentada (Figura 25 B y D), mientras que el ala izquierda desarrolló el color marrón normalmente (Figura 25 A y C). Por lo tanto se concluyó que las manchas se generan por presencia de NBAD-sintetasa en ausencia de células y se confirmó que los sustratos difunden en la hemolinfa.

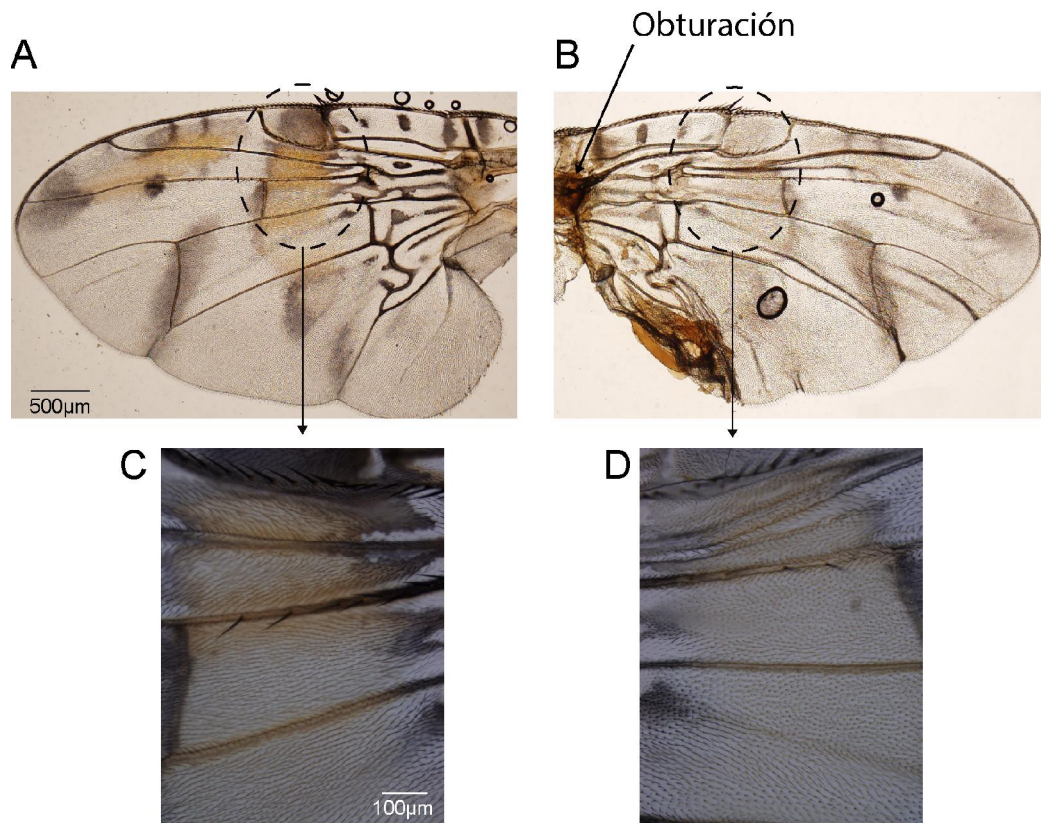


Figura 25. Ejemplo de la obturación por presión de las venas de alas de las moscas que inhibió la coloración marrón. El par de alas pertenece al mismo animal, el ala izquierda (A) no se alteró, mientras que el ala derecha (B) se obturó en la región axilar. C y D muestran en detalle la mancha marrón perteneciente a la región discal crossband. Tomado de (Pérez et al., 2018).

Actividad de la enzima NBAD-S en alas en ausencia de células

Por primera vez se pudo demostrar la presencia de actividad de la enzima NBAD-S en ausencia de células. La actividad de NBAD-S en alas enteras aisladas se modificó significativamente durante la transición adulto farado a exarado ($p < 0.001$) (Figura 26-A). La actividad de la enzima aumentó drásticamente desde los últimos momentos del estadio farado hasta la primera hora de vida como adulto exarado (Act. -24hs vs Act. 1h, $p = 0.0025$). Significativamente la actividad fue alta durante al menos las siguientes 144hs (6 días), sin variaciones significativas (Figura 26-A). Luego de 480hs desde la emergencia (20 días) se aún se midió algo de actividad residual de la enzima.

Para confirmar que la actividad que se midió anteriormente estaba restringida a las zonas coloreadas de marrón y no era homogénea en toda el ala, se diseccionaron porciones de la lámina gris, venas de las manchas marrones y de la zona de la futura mancha marrón a partir de alas de insecto de 24 hs de edad (Figura 26-B). Se confirmaron los resultados anteriores ya que, aunque se detectó actividad en todos los fragmentos analizados, las manchas marrones concentraron la mayor actividad de la NBAD-S, mientras que la lámina gris presentó niveles muy bajos de actividad.

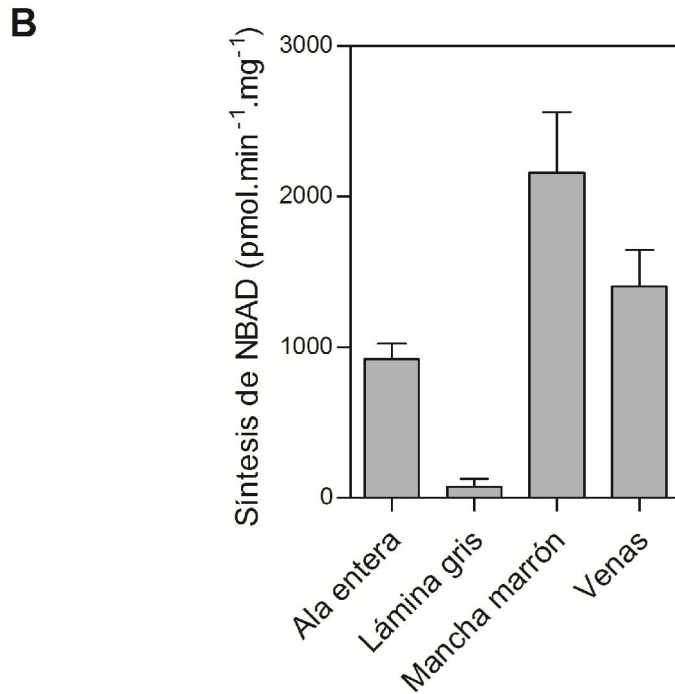
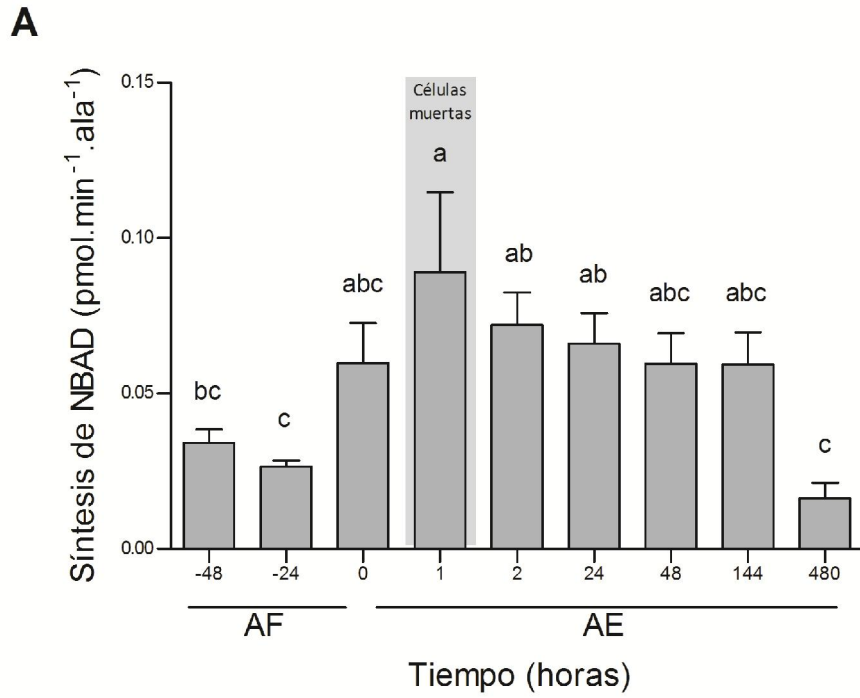


Figura 26. A. Actividad de la enzima NBAD-S en alas durante la transición adulto farado (AF) a adulto exarado (AE). **B.** Actividad de la enzima NBAD-S para diferentes secciones del ala. Letras diferentes indican diferencias significativas entre las medias ($p < 0,05$).

4.5 Conclusiones y discusión

4.5.1 Análisis de los eventos que acompañan la transición adulto farado-exarado.

Se debió construir una arena ad-hoc ya que las comerciales disponibles no fueron satisfactorias. También decidimos desarrollar nuestro propio sistema de grabación de video que permitió registrar hasta 12 moscas individuales simultáneamente, analizando así en detalle el comportamiento, la trayectoria y los períodos de descanso. La gran ventaja que tuvo desarrollar nuestro propio programa de registro fue disponer de una herramienta versátil y no estar limitado a las configuraciones de programas comerciales. Además, la mayoría de estas están pensadas para drosófilidos y no resultan conveniente para dípteros grandes. Disponer del código de programación nos permitió luego poder emplearlo en otros estudios comportamentales más complejos que serán presentados más adelante.

Determinamos la hora del día de la máxima emergencia de *C.capitata*, analizando las 24 horas del día, filmando 16 horas de día subjetivo y 8 horas de noche subjetiva. Los adultos mostraron un patrón homogéneo de emergencia y emergieron principalmente al medio día, 4 horas más tarde de que se encendiera la luz (día subjetivo). Coincidente con estos resultados se ha observado que en *Drosophila melanogaster* hay un pico máximo durante un día subjetivo largo, que da inicio luego de transcurridas las 2 primeras horas de luz (Nikhil et al., 2016).

4.5.2 Comportamiento post emergencia

Luego de la emergencia se determinó por primera vez la duración y características del período de extensión de alas (PEA) que estuvo constituida por dos etapas claramente distinguibles: una caminata continua (C) representando el 6.2% del PEA total y la etapa inmóvil (I) que resultó ser el 93.8% del PEA total, etapa durante la cual ocurrió la expansión de alas, seguido de la adquisición de la forma final del cuerpo. Nuestros resultados concordaron con estudios previos en *Sarcophaga crassipalpis* y *Sarcophaga bullata* realizados por Ždarek et al. (1986) y Ždarek and Denlinger (1987), respecto a las dos fases y

su duración relativa (aproximadamente 4.3% y 95.7 % para las etapa C e I, respectivamente). La observación de una etapa discreta de caminata y de inmovilidad podría estar asociada a la estrategia particular del ciclo de vida de *C. capitata*. En la naturaleza, la metamorfosis ocurre en suelo de los árboles hospederos, con el pupario frecuentemente enterrado debajo de unos pocos centímetros de sedimento flojo y hojarasca. Por lo tanto el adulto recién emergido de *Ceratitis* debe escapar de su entierro rápidamente hasta encontrar un sitio despejado donde desplegar sus alas y adquirir su forma y coloración final. Este comportamiento difiere del que hemos estudiado en trabajos anteriores empleando como animal de estudio a *Drosophila melanogaster* (Bochicchio et al., 2013), ya que en este insecto, los adultos recién emergidos alteran períodos de descanso y actividad hasta desplegar las alas por completo y adquirir la forma final del cuerpo. Esta diferencia puede deberse a que en *D. melanogaster* (mosca del vinagre) la pupariación, emergencia y forma final del cuerpo ocurre sobre el tejido expuesto de la fruta madura y fermentada (Hill, 1975).

Interesantemente, el registro del primer evento de ingesta fue luego transcurrido el PEA, alrededor de 10 minutos más tarde. En ningún caso se observó que la mosca se acercara a la comida hasta luego de finalizar el PEA, indicando que toda la energía utilizada durante el PEA fue provista por las reservas larvales. Otro evento particular fue que la deposición del meconio ocurrió luego de la primer ingesta. Esta primera deposición, que se caracterizó por ser más oscura y de mayor superficie que las siguientes defecaciones, podría ser necesaria para el aumento del volumen de líquido interno del insecto, necesario para la transmisión de las presiones hidrostáticas producto de los movimientos musculares del abdomen del insecto durante expansión de alas y adquisición de la forma final del cuerpo.

4.5.3 Coloración de las manchas marrones de las alas de *C. capitata*

Hemos determinado que la esclerotización y la pigmentación de la cutícula del ala comienzan durante la etapa de adulto farado, y en el momento de la emergencia el color de las alas es muy débil y grisáceo. Después de la aparición del adulto exarado la coloración pone en evidencia el patrón de manchas característico de esta especie. Las manchas del ala que presentarán color negro ya se distinguen con una coloración débil desde la emergencia del adulto y alcanzan su intensidad definitiva a las 48h. El color marrón progresó gradualmente (principalmente durante las primeras 24h post-emergencia) desde las venas hacia la lámina intervenosa hasta la adquisición del color definitivo 48h después de la emergencia.

Por primera vez se estudió la generación peculiar de las manchas marrones que dependen de la síntesis de NBAD. Hemos observado algo que no aparece en la bibliografía y es que el color de las manchas se establece primero por la coloración de los pelos y luego por el zócalo del pelo. Esto se observó fácilmente al comienzo de la coloración, cuando el zócalo de los pelos comenzó a adquirir color, mientras que la lámina circundante todavía era gris claro. Con el progreso de la coloración, el color del zócalo se intensificó.

Confirmamos que poco después de la extensión del ala, la mayoría de las células epidérmicas del ala desaparecieron, lo que concuerda con informes previos en moscas (Kimura et al., 2004; Seligman & Doy, 1973; Seligman et al., 1975). Por lo tanto, cuando la coloración de las manchas marrones comenzó a ser notable, la lámina del ala ya estaba privada de células. Pero entonces, ¿cómo se generó el color?. Nuestros resultados indicaron dos posibilidades: (i) el NBAD se exporta desde las venas hacia el zócalo del pelo, o (ii) la enzima NBAD-Sintetasa (NBAD-S) se sintetiza in situ.

Para abordar estas preguntas, medimos la actividad de NBAD-S en alas de adultos farados e imagos, y observamos que la actividad global se mantuvo durante varios días después de la emergencia, incluso después del final del proceso de coloración. Esto contrasta con la actividad epidérmica de NBAD-S en cutícula del cuerpo previamente

reportada por Perez et al. (2004) en nuestro laboratorio, donde fue alta durante las primeras 2 h después de la emergencia y casi desapareció 48 h después de la emergencia. Los resultados de esta tesis demuestran que la actividad NBAD-S está presente en las alas. Para determinar si la actividad estaba en toda el ala o si estaba restringida a las áreas marrones, cortamos porciones equivalentes de regiones del ala (venas, banda cruzada de intervenas marrones y lámina gris) y medimos la actividad de la NBAD-S demostrando que la enzima está presente sólo en las manchas marrones y venas marrones. Esta es la primera vez que se registra la producción de NBAD en las manchas marrones del ala debido a la presencia de la enzima en un entorno espacialmente restringido y libre de células, y con una actividad de vida prolongada.

Nuestros datos indican que la NBAD-S fue depositada por las células de la epidermis alar en la cutícula y/o matriz extracelular, antes de la muerte celular y permaneció unida a la cutícula en la región de la futura mancha marrón, quizás junto con restos celulares cercanos o dentro de los zócalos. No sabemos si la NBAD-S es exportada antes de la desaparición de las células o permanece asociada a la cutícula después de este evento. Hasta donde sabemos, no se ha reportado ningún péptido señal de exportación putativo en la proteína NBAD-S de *Drosophila* (llamada Ebony). Como el gen NBAD-S de *C. capitata* (Níger) aún no se ha secuenciado, no pudimos determinar si contiene o no un péptido señal. Sin embargo, existen muchos mecanismos no clásicos de secreción de proteínas en las células eucariotas (Nickel, 2003), por lo que el NBAD-S podría ser secretado a la matriz extracelular por un mecanismo no canónico. Se ha propuesto previamente que la proteína *Yellow* (responsable de la coloración negra de la cutícula del cuerpo) se secreta a la matriz extracelular (Kornezos y Chia, 1992) y aquí, nuestros resultados podrían sugerir que ocurriría lo mismo con el NBAD-S. Sin embargo podría ser simplemente una asociación del remanente celular conteniendo la enzima a sitios específicos de cutícula, determinados en el disco imaginal del ala.

La demostración de la persistencia de la enzima activa ha sido una novedad de gran interés desde el punto de vista bioquímico. La actividad extracelular de larga duración es

muy inusual y bastante sorprendente porque en nuestro laboratorio se demostró que la actividad de la NBAD-S decae rápidamente *in vitro* (Perez et al., 2010), a menos que se agregue 20% o más de glicerol al tampón de homogeneizado. Esto implicaría que en las alas la enzima debe estar en un entorno (cuticular, matriz extracelular) que estabilice la estructura funcional de la proteína y, por lo tanto, la actividad enzimática. Tampoco puede descartarse la existencia de alguna proteína chaperona que estabilice su estructura.

Ahora bien, si la NBAD-S está presente en las manchas y venas marrones, es necesario el suministro de los sustratos dopamina y β -alanina para la síntesis del NBAD. Hemos demostrado aquí que es necesaria la circulación de hemolinfa a través de las venas para el bronceado de las alas, ya que cuando las venas fueron obstruidas, las manchas 1 y 2 en las bandas cruzadas permanecieron sin colorearse. Estos resultados son comparables con los reportados por True et al. (1999), donde se demostró la importancia de la circulación de la hemolinfa en la esclerotización de la cutícula gris del ala de *Drosophila melanogaster*. La gran novedad es que aquí los sustratos circulan hasta encontrar la enzima.

Por tanto, hemos demostrado por primera vez la presencia de actividad enzimática extracelular de la NBAD-S en las alas de mosca y que los sustratos son difundidos a distancia desde las venas. También demostramos que esta enzima presenta un patrón temporal y espacial diferente en comparación con la actividad epidérmica transitoria que participa en la coloración marrón de la cutícula del cuerpo (Pérez et al., 2002; Pérez et al., 2018; Perez et al., 2010; Perez et al., 2004; Schachter et al., 2007; Walter et al., 1996).

El proceso de determinación del patrón de pigmentación marrón del ala en *C. capitata* aquí descrito en parte coincidiría con el proceso de dos pasos de pigmentación de melanina para *D. melanogaster* propuesto por True et al. (1999) y *Oncopeltus fasciatus* propuesto por Liu et al. (2014). Para las fenol-oxidasas que primero se sintetizan y exportan a la cutícula durante la etapa de adulto farado. Segundo, cuando el adulto emergió y expandió sus alas, los sustratos llegan por con la hemolinfa y son tomados por las fenol-oxidasas para iniciar la síntesis de melanina. La novedad de nuestros resultados es que demuestran que primero, la NBAD-S se dispondría espacialmente, en forma específica, en

las alas durante el desarrollo del adulto farado. Luego, los sustratos dopamina y β -alanina difunden gradualmente desde las venas y se conjugan para dar NBAD y lograr la coloración de las manchas, produciendo el patrón de color específico de las alas de la mosca mediterránea.

Dado que el patrón específico de coloración de las alas resulta fundamental para la comunicación intraespecífica e interespecífica, como la atracción sexual y la actividad disuasoria de los depredadores y otros (Rao N., 2012), resultó prioritario determinar cuándo se completaba este proceso para establecer el período de estudio de las interacciones entre machos jóvenes que se presenta en los siguientes capítulos de esta Tesis.

Capítulo 5

Caracterización del perfil comportamental de machos en un lek de laboratorio

5.1 Introducción

La agresión es un comportamiento innato que está presente en todos los animales, desde insectos hasta mamíferos (Lorenz, 1963; Tinbergen, 1951). La visión etológica comparte el concepto de agresión como un instinto (Lorenz, 1963; Tinbergen, 1963), sin embargo, agrega que el instinto de lucha innato no ocurre a menos que sea invocado por señales ambientales (McBride, 1971).

En dípteros como en otros insectos, el reconocimiento macho-macho es mayoritariamente vía comunicación quimiosensorial y esta mediada por el sistema olfativo y el gustativo (Dubnau, 2014; Fernández & Kravitz, 2013), aunque también participan señales visuales (Agrawal et al., 2014).

Al igual que en vertebrados, en los dípteros, los niveles de aminas como ser la octopamina, dopamina y serotonina influyen en la agresión (Kravitz & Huber, 2003). Más recientemente péptidos como el péptido F (ortólogo del neuropéptido Y de vertebrados), *insulin-like* y las taquiquininas (neuropéptido) de *Drosophila* estarían involucradas en la modulación de agresión (Kravitz & Fernandez, 2015).

En estudios pioneros el Dr. Hoffmann (1987) realizó una descripción detallada de los eventos de interacción en moscas de *Drosophila melanogaster* y *Drosophila simulans*. Estos antecedentes, sumado al creciente desarrollo herramientas genéticas en este género, contribuyeron a que *Drosophila melanogaster* sea uno de los modelos más estudiados en el área de neurofisiología del comportamiento y en particular en comportamientos de agresión (Fernández & Kravitz, 2013; Kravitz & Fernandez, 2015).

En muchos animales existen agregaciones de machos que compiten por un espacio donde llegarán hembras para ser copuladas (Shelly, 2018). A las eventuales señales químicas de agregación se suman las visuales y auditivas, estableciéndose secuencias comportamentales que desplegadas en un espacio determinado configuran agrupamientos llamados *leks* (Beehler & Foster, 1988; Lloyd, 1867). Esta denominación se utilizó primero en aves (Lloyd, 1867), sin embargo se han descrito leks en numerosas especies desde insectos hasta mamíferos (McBride, 1971). Sin embargo no hay estudios que describan ni la existencia del *lek* ni agrupaciones comparables en *Drosophila melanogaster*, tal cual se lo

define para los dípteros mencionados más adelante en el texto (Wilkinson & Johns, 2005). Groseramente se pueden visualizar 3 etapas en el lek: La agregación, la competencia territorial entre machos y la interacción final con hembras. Esta implica competencia de machos, preferencia de apareamiento de hembras y cópula (Shelly, 2001).

Entre los tefrítidos se han descrito dos patrones generales de apareamiento que están asociados con diferencias en el comportamiento de alimentación y oviposición (Wilkinson & Johns, 2005). Las especies monófagas, que normalmente tienen una distribución templada, generalmente se aparean en la planta huésped donde se produce la oviposición. En contraste, las especies polífagas, la mayoría de las cuales son tropicales, por lo general se aparean en agregaciones que se forman en la superficie de las hojas en o cerca de una planta huésped. (Burk, 1981; 1984; Dodson, 1986; Prokopy & Hendrichs, 1979; Yuval et al., 1998). Las agregaciones de machos en determinadas zonas de los árboles permitiría el aumento de la tasa de encuentro con hembras (Field et al., 2009), un proceso conocido como efecto "hotspot" (Bradbury & Gibson, 1980). La agregación y enfrentamientos de las moscas también puede ocurrir en los sitios de alimentación o recurso, como es en el caso del tefrítido *Rhagoletis pomonella* (Smith & Prokopy, 1980) o en drosofilidos (Markow, 1996).

Los adultos machos de la mosca del mediterráneo se congregan en árboles o arbustos fuera del fruto o recurso (Benelli, 2014a; b). Desde las hojas, los machos producen señales olfatorias (feromona de llamado), auditivas y visuales, que atraen a otros machos y también a las hembras al área de reunión donde se arma el grupo, denominado *lek* (Benelli et al., 2016; Bradbury & Gibson, 1980; Shelly, 2018; Shelly & Whittier, 1997). Aluja and Birke (1993) también definieron a esta agregación de machos de *Ceratitis* como un típico "*lek*" que se forma con al menos tres machos dentro del árbol hospedero. Se ha observado en ambientes naturales que en el "*lek*" los machos de *Ceratitis capitata* primero cooperan al agregarse y generan un núcleo atractivo para las hembras, luego compiten entre ellos con el fin de defender pequeños territorios donde realizan el llamado y posterior apareamiento con las hembras (Arita H. & Kaneshiro, 1985; Benelli, 2014a; Kaspi & Yuval, 1999; Prokopy &

Hendrichs, 1979). Los *leks* son dinámicos, los machos se congregan a la mañana en lo alto de los árboles, posicionándose (mayoritariamente) sobre el envés de las hojas, luego defendiendo el área como su territorio de cortejo y se dispersan al final de la tarde (Kaspi & Yuval, 1999; Prokopy & Hendrichs, 1979) (Figura 27).



Figura 27. Macho de *C. capitata* en postura de llamado, exponiendo una gota de feromona en el envés de una hoja. Tomado de Nishida et al. (2000).

En *Ceratitidis* se ha detectado que los machos jóvenes, durante la secreción de la gota feromona en la punta del abdomen en el *lek*, emiten al menos 15 compuestos volátiles diferentes (Siciliano et al., 2014) aunque otros autores informaron que son más de 50 compuestos (Jang et al., 1989). En particular los machos secretan el compuesto 2-methyl-6-vinyl pyrazine conocida como “feromona del *lek*” que atrae a las hembras al sitio de *lek* (Chuman et al., 1987; Shelly, 2001).

Varios autores (Arita H. & Kaneshiro, 1988; Benelli, 2015; Briceño, 1999; Prokopy & Hendrichs, 1979; Shelly, 2000; 2018) han realizado una descripción de los patrones comportamentales individuales que exhiben los machos de *Ceratitidis* en los enfrentamientos macho-macho que ocurren en los *leks* en condiciones naturales y semi-naturales. Por su parte, Benelli (2015) ha analizado en detalle los enfrentamientos entre dos machos en condiciones artificiales de laboratorio mediante video grabaciones en un sistema de dos dimensiones (las moscas no podían volar). Sin embargo, estos estudios no se realizaron en una configuración de *lek* sino que se enfocaron a analizar la agresión entre machos. A pesar de los estudios publicados no se han analizado en detalle ni los tiempos de la dinámica del *lek* ni tampoco el perfil de cada individuo dentro del mismo, que encaramos en esta tesis.

5.2 Objetivo

En esta etapa de la tesis, se planteó establecer y analizar, por primera vez, un *lek* experimental de 3 individuos o *lek* mínimo en el laboratorio. Se analizaron los patrones comportamentales en esta situación experimental y se los comparó con los que han sido estudiados por otros autores en condiciones naturales.

5.3 Materiales y métodos

Con el propósito de alcanzar este objetivo se ensayaron distintas opciones para el establecimiento del *lek*. Para cada *lek* experimental, se seleccionaron 3 machos al azar a partir de las poblaciones machos vírgenes de 100 individuos de 4 días de edad. Para poder individualizar las actividades de cada uno de los tres machos en el *lek*, se los identificó con una marca en el tórax, con un pincel de pelo de marta con pintura acrílica color blanco (código 7301; Plantec®, Argentina). Se eligió el tórax ya que es un tagma con superficie lo suficientemente grande como para marcarlo en forma manual y por su fácil identificación en los ensayos posteriores (Figura 28).

Se realizaron experimentos preliminares donde se probó alternativamente el uso de anestesia por frío. Se descartó el procedimiento porque las moscas, al ser enfriadas, acumularon rápidamente micro gotas de humedad en la superficie de la cutícula, siendo en las alas el principal problema, ya que debido a su gran tamaño se plegaban y arrugaban, deformándose. Por lo tanto se optó por anestesia bajo CO₂.

Para la identificación se anestesiaron muy levemente los tres adultos al mismo tiempo, empleando un flujo bajo de CO₂ y la marcación se hizo bajo lupa. En la Figura 28-A se muestra el código de identificación. Luego de la marcación y antes de la desaparición de la anestesia se colocaron rápidamente los tres machos en la arena experimental (Figura 28-B).

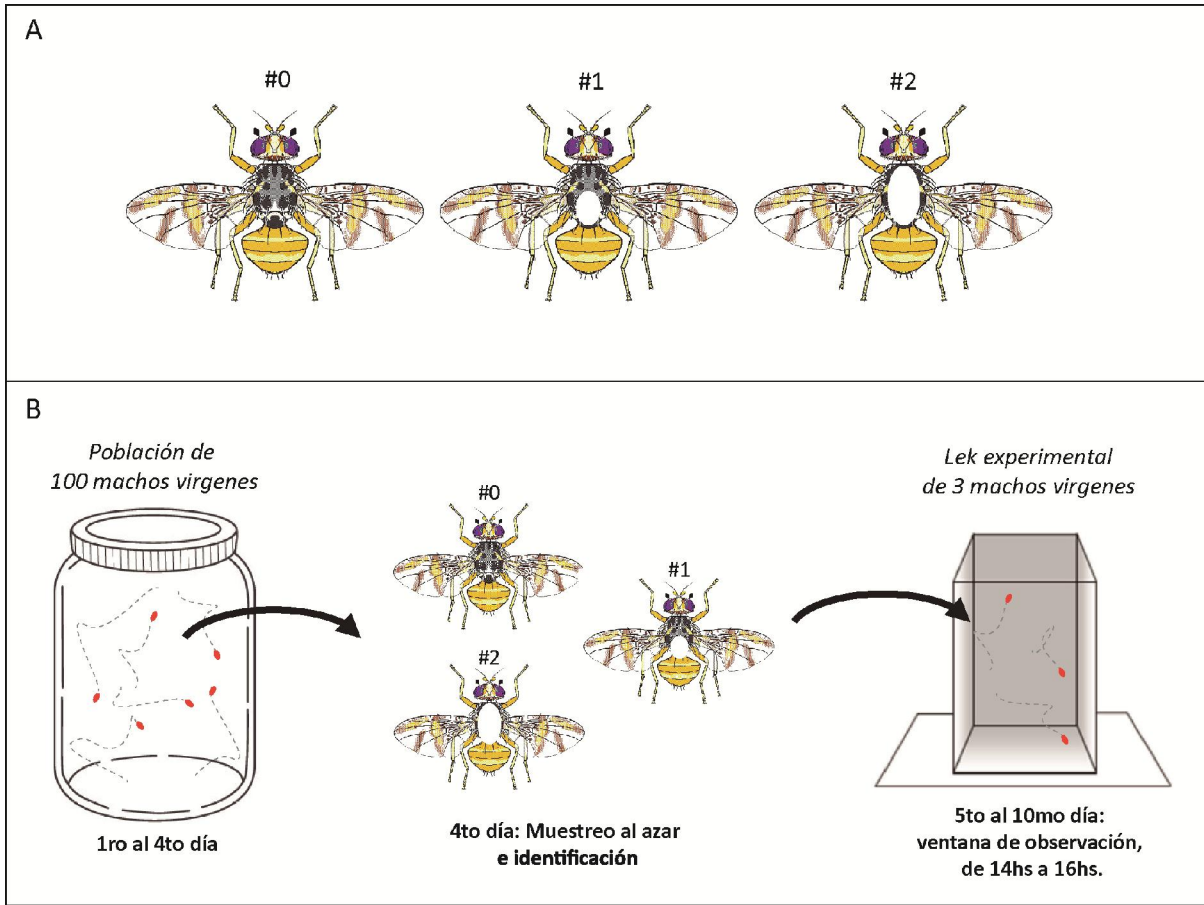


Figura 28. Armado y montaje del lek experimental. **A.** Código de identificación: (#0) Mosca sin marca = individuo 0 (#1) Mosca con media marca en el tórax = individuo 1. (#2) Mosca con marca completa en el tórax = individuo 2. **B.** Esquema de iniciación del lek.

5.4 Resultados

5.4.1 Diseño y construcción de arena experimental ad-hoc para leks.

Tal como sucedió para el estudio de los eventos pre y post emergencia, los equipos comerciales convencionales no resultaron satisfactorios a nuestras necesidades experimentales. Por lo tanto el autor de esta tesis debió diseñar y construir una arena *ad hoc* para el estudio del *lek*, que por ser un diseño original, acompañado de herramientas computacionales de registro especialmente diseñadas, se incluye en resultados.

Construcción de arenas experimentales

Las arenas se construyeron con placas de vidrio 2mm. Se eligió al vidrio transparente como material ya que es inerte, desarmable, de fácil lavado y no se daña o impregna de olores como el acrílico. En los ensayos preliminares, que formaron parte de la puesta a punto del sistema de filmación, se emplearon arenas con base rectangular o cuadrada. Los resultados no fueron satisfactorios, ya que esto no permitía identificar fácilmente a los insectos que recorrían las paredes (Figura 29-A). Se determinó que la perpendicularidad de las paredes impedía la identificación de los animales generando puntos ciegos en la filmación. Luego de numerosos ensayos, se eligió la forma de base trapezoidal ya que permitió conseguir un punto de fuga de la figura en el espacio mucho más próxima, generando una perspectiva frontal mucho más cónica que la natural. El resultado fue una arena experimental en forma de prisma trapezoidal (Figura 29-B). Se añadió al interior de la misma un papel opaco (papel vegetal de plano) para obtener un fondo con los vértices redondeados y así mejorar el contraste con las moscas. Esto permitió una distribución homogénea de la luz y mejorar la calidad de filmación en cualquier lugar de la arena experimental (Figura 29-C).

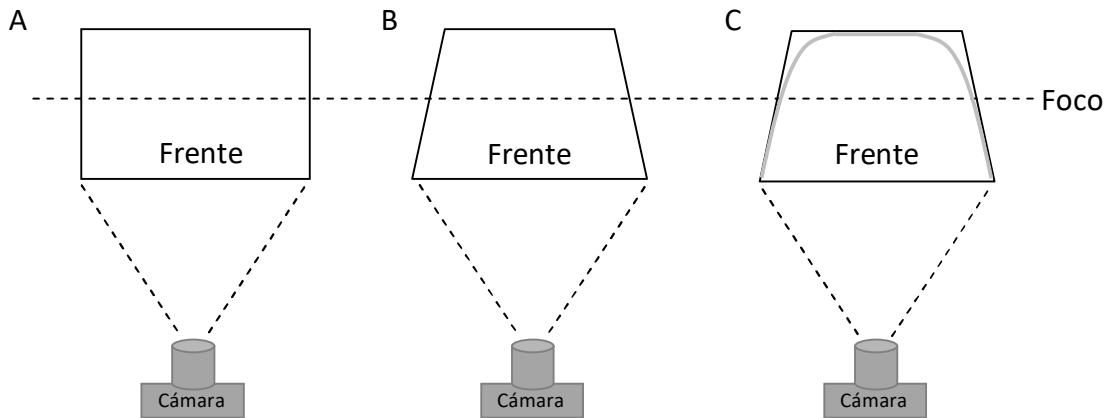


Figura 29. Esquema en *vista aérea* de las distintas disposiciones de los vidrios de las arenas experimentales: **A.** base rectangular, **B.** base trapezoidal y **C.** base trapezoidal con papel difusor de luz. La línea horizontal indica el foco de la cámara.

Las dimensiones del prisma fueron 75x85 mm de frente, 55x85 mm por detrás y 55 mm de profundidad (Figura 30-A). La tapa, también de vidrio, es de 60x160mm. El área de 75x85 mm, que correspondiente al frente de la pecera, fue del tamaño óptimo para el cuadro de registro de video de la cámara. Cada cámara estuvo dedicada a la toma de imágenes de una sola pecera (Figura 30-B).

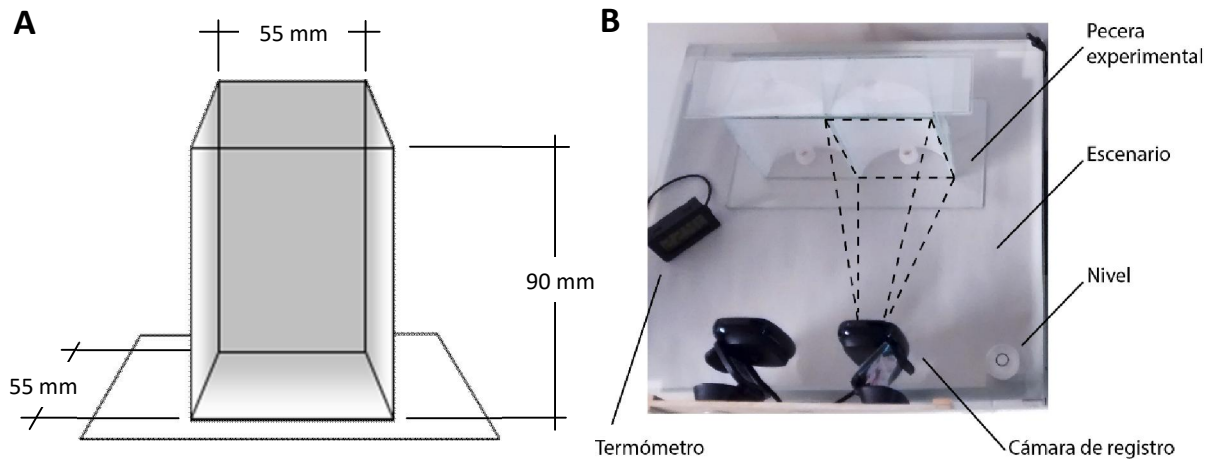


Figura 30. A – Esquema detallado de la arena experimental construida. La imagen no está a escala. C- Fotografía de la disposición de las arenas experimentales dentro del set de filmación.

La iluminación, los programas de registro y de análisis de video fueron los mismos que los detallados en el capítulo anterior. La Figura 31 muestra un esquema en vista frontal, donde se visualiza cómo fue el montaje general de los prismas en el escenario experimental.

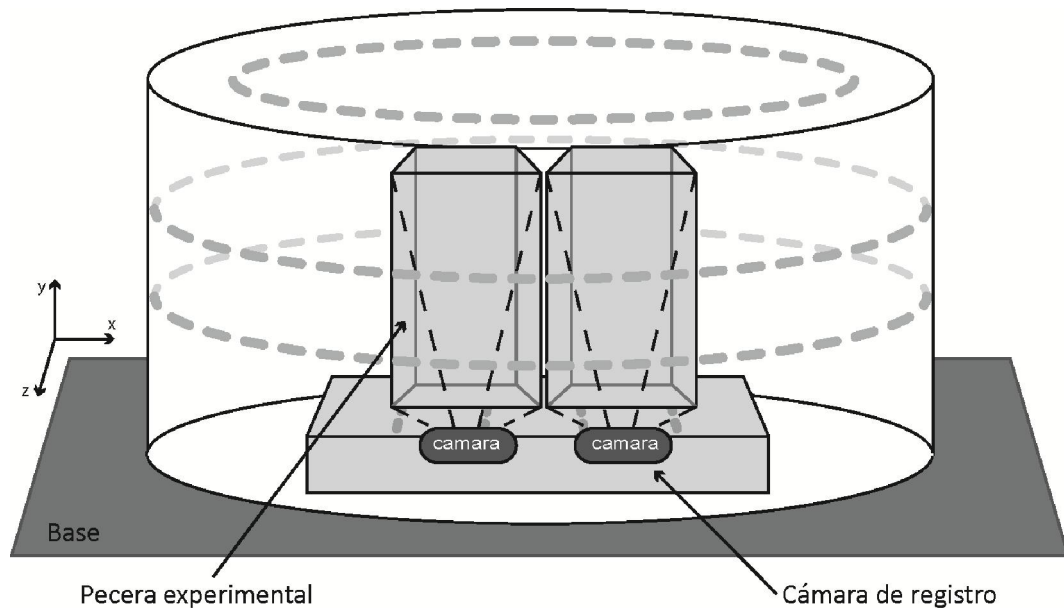


Figura 31. A-Esquema de la disposición general del escenario y la pecera. Para más detalles del escenario ver capítulo 4.

5.4.2 Establecimiento de los lek de laboratorio

Luego de la emergencia y transcurridos los eventos que culminan con la adquisición de la coloración y forma final de la mosca macho, a la par de la maduración sexual, comienza una nueva etapa en el ciclo de vida de la mosca *Ceratitis capitata*, la etapa adulta.

En la naturaleza las moscas *C. capitata* inician el lek a partir de la llegada y agregación de 3 o más machos a un sitio del árbol hospedero (Arita H. & Kaneshiro, 1985). En nuestro sistema experimental imitamos un lek mínimo partiendo de la presencia de 3 machos elegidos al azar de una población general de 100 machos vírgenes previamente sexados al primer día de edad y mantenidos durante 4 días en frascos poblacionales. En experimentos preliminares observamos que, durante los 3 primeros días como adulto exarado, los cultivos de machos aislados en frascos de 100 individuos no mostraron gran actividad de vuelo o

movimiento en general. Empleamos la aparición en el abdomen de la gota de feromona como un marcador fenotípico de la maduración sexual de los machos aislados (Figura 32).

En nuestras condiciones experimentales, recién entre el 3er y 4to día de edad se observó la secreción de la gota de feromona en la punta del abdomen de los machos.

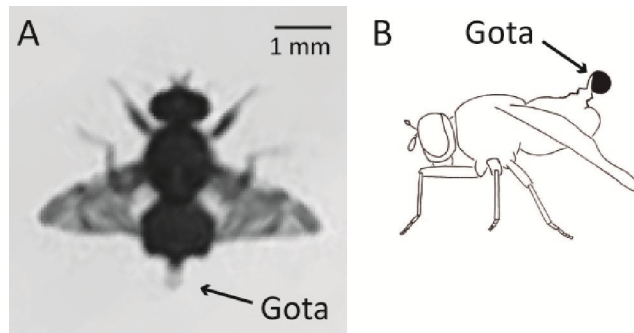


Figura 32. Exposición de gota de feromona en extremo posterior del abdomen del macho de C. capitata. **A:** Fotografía en vista dorsal de un macho de C. capitata exponiendo la gota de feromona en el lek experimental. **B:** esquema en vista lateral de la mosca, que ejemplifica la exposición de la gota de feromona en el extremo del abdomen. Dibujo tomado de Briceño et al. (1996).

Por lo expuesto decidimos montar el lek experimental a partir del 4to día, partiendo de la premisa de que durante el transcurso de tiempo entre el 1ro y 4to día, todos los machos que luego formaran parte del lek experimental:

1. Adquirieron la forma final del cuerpo y terminaron la tanificación alar y del cuerpo.
2. Tienen capacidad dispersiva (vuelo y caminata).
3. Todos los machos en el frasco de 100 individuos tuvieron la misma experiencia previa y que todos alcanzaron la madurez sexual al 4to día.

5.4.3 Primeros momentos del lek

El *lek* se observó en una ventana de tiempo constante, que fue desde las 14hs (ZT-6) hasta las 16hs (ZT-8), todos los días desde 5to al 10mo día de edad inclusive, obteniendo 12hs de video por cada arena experimental. Las moscas, inmediatamente después de la ligera anestesia, fueron colocadas en el *lek* experimental con la ayuda de un pincel en el fondo de la arena experimental. Se colocó 1 ml de alimento (3:1 de azúcar: levadura disuelta en agar 1%), contenido en una tapa plástica transparente de 0,8 cm de diámetro.

La Figura 33 muestra, a modo de ejemplo, lo que ocurrió en el 4to día durante el ensamble de uno de los *lek* artificiales. Corresponde al registro de la primera hora de actividad (de 14 hs a 15 hs). El 4to día fue el día previo al registro periódico de actividades para todos los análisis posteriores, desde 5to al 10mo día. El 4to día fue el día de habituación de los machos al *lek* experimental y día de recuperación del manipuleo. En este ejemplo, la mosca #0 tardó 14 segundos en comenzar a desplazarse, la #1 tardó 22 segundos y la #2 tardó 19 segundos. Luego se desplazaron sin tener aparente interacción el uno con el otro; donde cada uno desde ese entonces se estableció como un residente zonal del *lek* (Figura 33-A). Se observaron reiterados eventos de detención donde se observaron comportamientos de limpieza de cabeza con el primer par de patas anteriores y también de alas y tercer par de patas (Figura 33-B), el rango de tiempos de limpieza fue desde los 0.54 min hasta los 7.06 min.

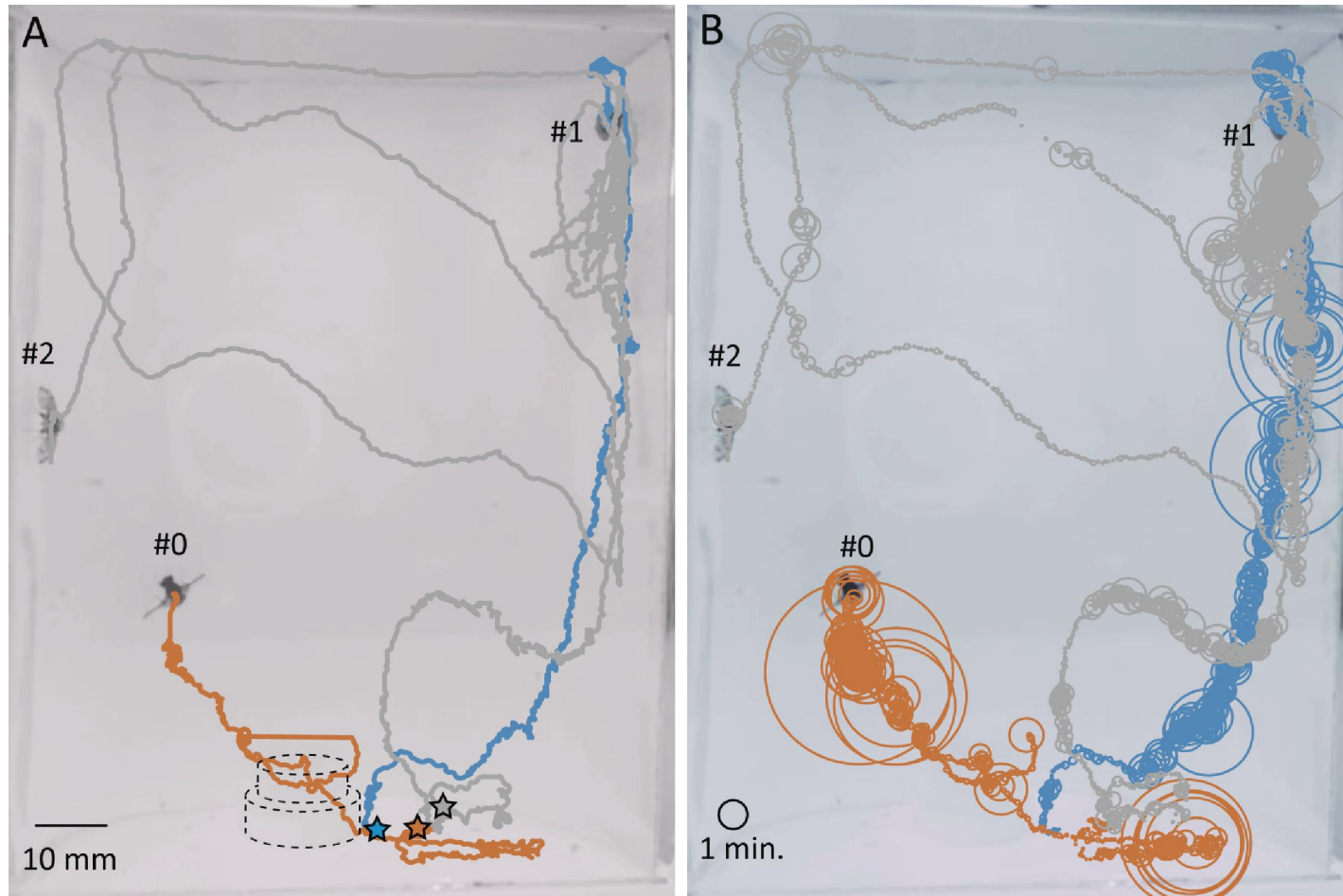


Figura 33. Primeros momentos del lek experimental. **A.** En *naranja*, *celeste* y *gris*, se muestra la trayectoria de la mosca #0, #1 y #2 respectivamente desde que fueron colocadas en el fondo de la arena hasta transcurrida la primera hora de video. **B.** Gráfico de burbujas que muestra el tiempo de detención para cada punto estimado de la trayectoria graficada en **A**, a mayor tiempo de detención mayor diámetro. El círculo negro es la referencia de relación diámetro/tiempo. La línea punteada resalta la ubicación del alimento + agua. Las estrellas indican el lugar donde fue colocada cada mosca al inicio del experimento y fue el punto de inicio para la trayectoria registrada en el ejemplo.

5.4.4 Comportamientos individuales dentro del lek

Sobre un total de 16 *leks* experimentales válidos, se analizaron 192hs de video-grabaciones se registraron en promedio 241.1 ± 68.2 interacciones por experimento. La tabla 2 muestra el número de interacciones que se registró para cada experimento, donde el valor mínimo observado fue de 118 y un máximo de 389 peleas.

<i>Leks</i> experimentales válidos	
Nro. Experimento	Nro. de interacciones
1	276
2	124
3	288
4	270
5	191
6	248
7	303
8	233
9	238
10	213
11	180
12	389
13	223
14	288
15	276
16	118
Promedio	241.1±68.2
Valor min.	118
Mediana	243
Valor máx.	389

Tabla 2. Número de interacciones registradas para cada experimento analizado. En negrita se muestra el valor promedio de interacciones ($media \pm D.E.$), valor mínimo y valor máximo de la distribución del número de interacciones y el valor de la mediana.

5.4.4.1 Interacciones macho-macho dentro del lek

Se determinó que todas las interacciones siempre fueron de a pares y se observaron tres tipos de comportamientos individuales en el momento de producirse cada interacción:

A – Residente “espectador”: mosca residente del lek que no interacciona físicamente con ninguna otra. Se mantiene en posición distante.

B – Residente “defensor”: mosca residente del lek que interacciona y/o enfrenta a otra mosca que se aproxima a su zona (mini territorio).

C – Residente “invasor”: mosca que abandona su postura de residente no interactivo y se aproxima a otra mosca defensora.

Inicialmente, en cada experimento, los tres machos del lek fueron "residentes". Sin embargo, en los 16 experimentos analizados, siempre ocurrió que una mosca se desplazó por la arena “visitando” el pequeño territorio de sus compañeras. Esta mosca “invasora” o bien pudo desplazarse directamente hasta la zona de otro macho “residente” y enfrentarse con él (el macho visitado pasaría a ser "defensor"), o visitar varios territorios sin traspasar umbrales (ver más adelante). Cuando la mosca "visitante" se enfrenta con uno de los residentes, la mosca "visitante" pasa a ser "invasor" y el otro residente a ser "defensor", quedando la tercer mosca expectante. En todos los casos tras el avance del “invasor”, se observó que la mosca “visitada” pasó de un estado pasivo a un estado activo.

Resultó muy importante determinar si la "distancia umbral" que debe existir en cada caso para que un residente defensor pase de un estado pasivo a uno activo es constante o variable y si existe una distancia mínima para que el defensor reaccione ante la presencia del visitante. En nuestras condiciones experimentales el rango de distancia de reacción fue entre 39.0 mm y 13.5mm. Por lo tanto se puede postular una distancia umbral muy laxa ya que el coeficiente de variación fue del 30% (distancia media= 26.9 ± 8.0 mm; mediana= 26.1mm). (Figura 34-A)

Tras haber alcanzado un primer umbral de distancia demostramos que se genera una secuencia variada de eventos. Para facilitar la descripción de sucesos observados que fueron observados en todos los experimentos, se detallarán las observaciones generales para cada etapa de la secuencia comportamental a las que se le sumarán ejemplos que ilustren el análisis general.

1. Interacción inicial

Actitud del defensor: En cada ocasión, cuando el invasor alcanzó la primer distancia umbral (d_1), el macho defensor alineó su cuerpo hacia el visitante (Figura 34-A), siguiendo la actividad del mismo pivotando sobre su eje (Figura 34-B). De acuerdo a la nomenclatura y criterios de identificación de las posturas alares propuestos por Briceño (1999) se determinó que el seguimiento del visitante por parte del defensor fue acompañado con las alas en posición arqueadas (*arching wings* =AW)(Figura 35 A-B). Este patrón se mantuvo hasta una distancia promedio de 7.8 ± 0.8 mm (distancia d_2 , Figura 34-B). Esta distancia promedio constituiría un segundo umbral, con un rango mucho más estrecho que la distancia umbral d_1 (rango d_2 : valor máximo 8.8mm; valor mínimo 7.8 mm.)

Actitud del visitante: Cuando el macho visitante se acercó y alcanzó la distancia umbral (línea punteada 1, Figura 34-B) y lo sobrepasó, recorriendo el pequeño territorio del defensor también con sus alas arqueadas (AW); hasta que se alcanzó un segundo umbral donde ambos insectos se encuentran a la distancia d_2 , ambos abandonaron la posición de alas AW para pasar a una posición de alas sobre su dorso (*Wings* = W) (Figura 35 C-D).

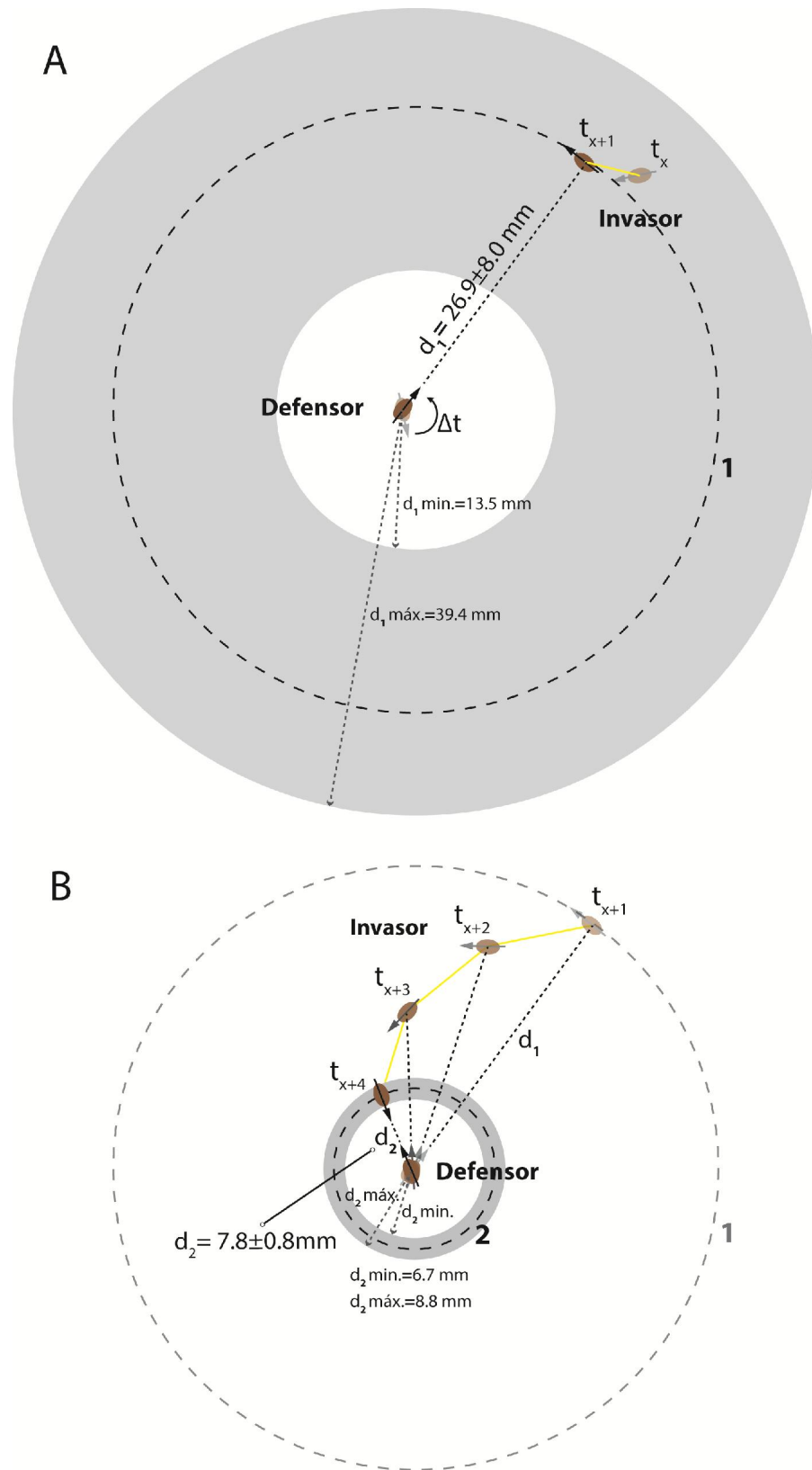
Por tanto, tras estos patrones comportamentales, repetidos en cada acercamiento, en cada experimento quedaron determinados dos umbrales del enfrentamiento desde la perspectiva del defensor:

Umbral 1: límite máximo de acercamiento de la mosca invasora sin reacción del defensor, $d_1=26.9\pm 8.0\text{mm}$, con un rango entre 39.4mm y 13.5mm. (Línea punteada 1, Figura 36-A).

Umbral 2: límite máximo de acercamiento de la mosca invasora sin interacción física entre ambos contrincantes, $d_2=7.8\pm 0.8\text{mm}$, con un rango entre 8.8mm y 6.7mm (Línea punteada 2 negra, Figura 36-B).

Figura 34 (página siguiente). Esquema en vista aérea que ilustra el encuentro entre dos moscas en lek experimental. **A-** El macho invasor se acerca al animal defensor y cruza el primer umbral (1) de aproximación de 26.9 ± 8.0 (d_1), el animal defensor reacciona ante la presencia del invasor, rotando sobre su eje apuntado su parte anterior hacia el invasor. **B-** el macho defensor sigue el desplazamiento del invasor, pivotando sobre su eje. El invasor se aproxima hasta una distancia umbral de aproximación de $7.8\pm 0.8\text{mm}$ (d_2). La línea amarilla indica la trayectoria descrita por el invasor a cada instante t_x . La flecha indica la orientación antero-posterior del animal, la punta de flecha simboliza la cabeza del insecto. En gris se marca la zona delimitada por el valor mínimo y máximo de la distancia umbral medida para d_1 y d_2 .

Figura 34.



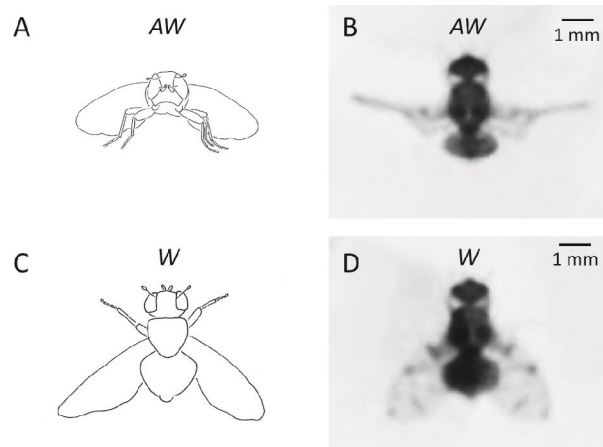


Figura 35. Disposiciones alares observadas durante el evento de aproximación en un enfrentamiento dentro de un lek experimental. **A-B:** postura de alas en posición arqueada (“arching wings” =AW), **A-** esquema en vista frontal de la mosca en postura de AW; **B** – fotografía en vista dorsal de la mosca en postura AW. **C-D:** postura de alas sobre el dorso de la mosca (“wing” = W), **C-** esquema en vista dorsal de la mosca con sus alas en posición W; **D** – fotografía en vista dorsal de la mosca en postura W. La barra es la referencia de escala.

2. Enfrentamiento sin contacto

Una vez que el visitante alcanzó el límite interno dentro del territorio del defensor (umbral 2), ambos contrincantes quedan enfrentados alineados en sus ejes y mantuvieron una distancia de separación constante de $7.8 \pm 0.8 \text{ mm}$, sin contacto físico. Se documentaron los siguientes comportamientos:

Actitud del defensor: El defensor comienza a mover rápidamente sus alas, con un patrón de movimiento de “vibración de alas” (*wing vibration* = WV). Este comportamiento filmado resultó interpretable como idéntico al descrito por Briceño (1999) (ver dibujo Figura 36). El aleteo constante fue interrumpido por breves pausas. A este nuevo patrón se lo denomina “vibración de alas corto” (*short wing vibration* = SWV); durante este nuevo movimiento de alas intermitente se observó el movimiento de lado a lado de la cabeza.

Actitud del visitante: se observó que la mosca abandona la posición anterior de alas AW (Figura 35 A-B) y pasa a tomar la posición W y se aleja del territorio del defensor (Figura 35 B-H).

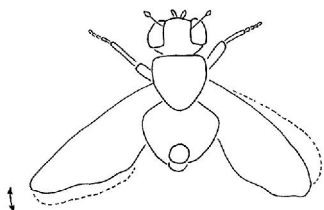


Figura 36. Vibración de alas de mosca macho en el lek experimental. La vibración de alas puede ser constante (WV) o con breves interrupciones (SWV). El esquema muestra el patrón general de movimiento de alas. Para mayor diferencia entre WV y SWV ver Figura 39.

En la Figura 37 se muestra, a modo de ejemplo, lo ocurrido en una pelea sin contacto físico en uno de los *leks* experimentales. Esta figura se complementa con el video suplementario: “*video_suplementario_Figura37.avi*”.

En la Figura 37 A-B se observa que a partir de la distancia umbral d_1 , que en este ejemplo fue de 17.4mm, el defensor pivoteó y alineó sobre su eje antero-posterior con el del visitante. Durante este intervalo de tiempo ambos tienen sus alas en posición AW.

En la Figura 37 B-C se ve el inicio del enfrentamiento, donde una vez atravesado el umbral 1 (línea punteada 1 gris) el visitante continúa aproximándose, seguido a cada instante por el defensor, hasta que alcanzan la distancia de aproximación d_2 , que en este ejemplo fue de 8.3mm.

El defensor mueve sus alas activamente, alternando los movimientos WV, SWV (Figura 37 C-D) y luego WV (Figura 37 E-F), el visitante se aleja del umbral 2 (Figura 37 E, línea punteada 2 gris) y abandona luego el territorio sin llegar a ocurrir un contacto físico (Figura 36 G).

La Figura 37 H resume todos los cuadros anteriores (del A al G) formando una imagen montada. En este ejemplo se puede observar el umbral 1 de diámetro $d_1=17.4\text{mm}$ y el umbral 2 de diámetro $d_2=8.3\text{mm}$. La línea amarilla simboliza la trayectoria real descrita por el visitante, mientras que la celeste indica la del defensor. Se observa el pivote del defensor siguiendo al visitante, y como el visitante camina sobre el arco del umbral 2 hasta que se aleja.

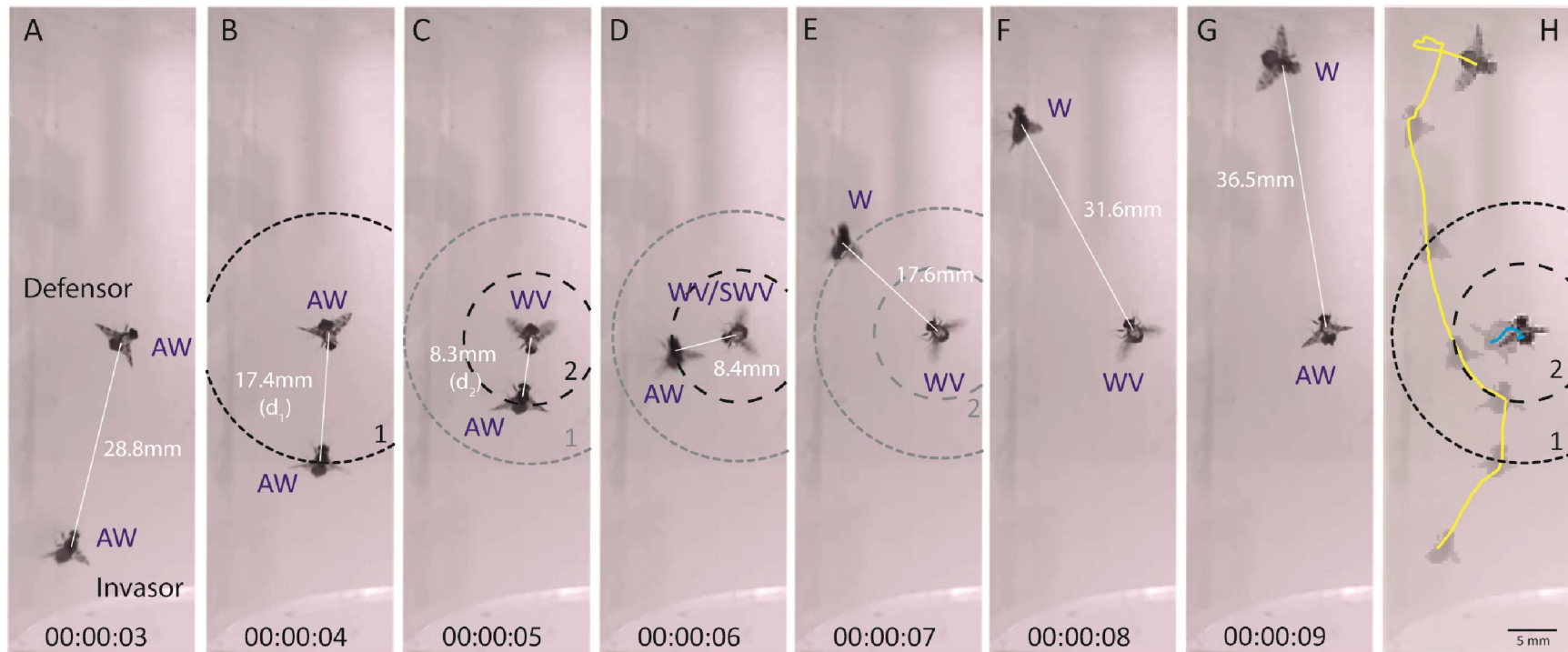


Figura 37. A-G: Fotograma que ilustra la secuencia de eventos en una situación de enfrentamiento real sin contacto físico en un lek experimental. Se muestran las imágenes capturadas a intervalos de 1 segundo, desde que el defensor advierte la presencia del invasor (A-B) hasta que éste se retira del territorio defendido (G). En blanco se muestran las distancias que separó a las moscas. D_1 = distancia umbral 1, D_2 =distancia umbral 2. En azul se indican los movimientos y posturas alares. W= alas montadas; AW=alas arqueadas; WV=wing vibration; W=wing. H: imagen montada a partir de los cuadros A-G, en línea punteada se muestran los límites de los umbrales 1 y 2. En amarillo se indica el desplazamiento real del invasor y en celeste el del defensor. Ver video anexo “video_suplementario_Figura37.avi”.

3. Enfrentamiento con contacto físico (pelea)

Si durante la primer fase de enfrentamiento el visitante no se alejó, inmediatamente se produjo siempre una pelea, interacción física entre ambos contrincantes.

Situación de "Pelea tipo 1":

Actitud del defensor: La mosca defensora mantuvo su posición, mientras se conservó la distancia del umbral 2 (d_2) específica de ese defensor, moviendo sus alas de forma SWV. Luego de que el visitante pasó la distancia de acercamiento d_2 , la defensora arremetió contra el visitante golpeando con la parte anterior del cuerpo. Principalmente se pudo distinguir que la cabeza y el primer par de patas fueron las que hicieron contacto la parte anterior del visitante. Este comportamiento ha sido llamado "topada frontal" (Figuras 38 y 40).

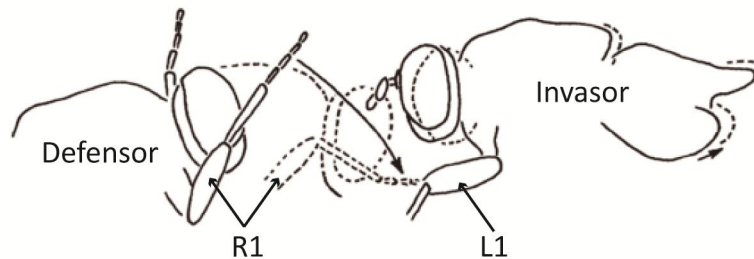


Figura 38. "Topada frontal" Esquema de una pelea con interacción física, se observa al defensor golpeando con la pata delantera derecha del primer segmento del tórax (R1) a la pata izquierda del primer segmento del tórax (L1) mientras arremete con un golpe de cabeza sobre el invasor.

Actitud del visitante: Mientras la mosca visitante mantuvo una distancia umbral 2 (d_2) del defensor, mantuvo sus alas en posición W. Cuando avanzó y atravesó ese umbral, la mosca mantuvo las alas en posición W y recibió el impacto del defensor en movimiento topador.

Tras la topada frontal, se observaron casos donde uno de los dos machos cayó al fondo de la arena en la mayoría de los casos sobre sus patas (posición prono,

Figura 39-A) y eventualmente en posición supina (Figura 39-B). Este evento de caída en posición supina lo hemos documentado como "caída inducida" (ver página 98).

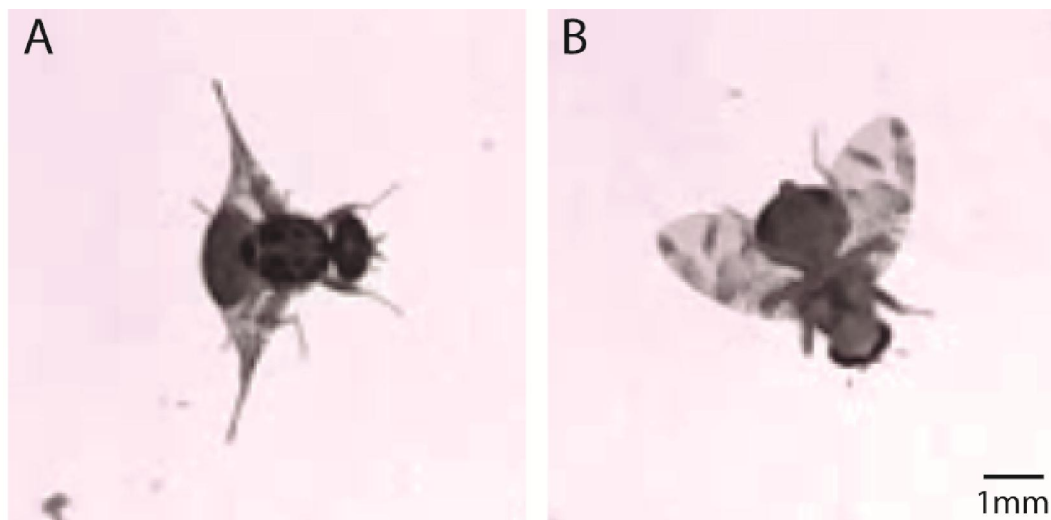


Figura 39. Vista aérea de mosca macho de C. capitata en: **A-** posición prono y **B-** posición supina.

Ejemplo de "pelea tipo 1"

En la Figura 40 se muestra, en forma de ejemplo, lo ocurrido en una pelea con contacto físico del tipo 1, durante uno de los *leks* experimentales. Para el seguimiento de los eventos abajo descritos, se facilita en el material suplementario, el video correspondiente a la figura: "video _suplementario _Figura40.avi".

Figura 40 A-B: Al igual que lo que se describió en la Figura 40, la mosca defensora se puso en alerta luego del que el visitante se acercó a una distancia umbral 1, que en este ejemplo fue de 27.7mm. Se observó que la mosca visitante se desplazó con las alas en posición AW y defensora pasó de tener sus alas en posición AW a WV.

Figura 40 C-L: Una vez atravesado el umbral 1 (línea punteada 1 gris, Figura 40-B), la mosca visitante continuó acercándose a la mosca defensora hasta una distancia de 9.1mm (Figura 40-C), esta distancia se mantuvo prácticamente sin variaciones durante un intervalo de 10 segundos. El rango de valor máximo registrado fue de 9.8mm mientras que el menor

fue de 8.2mm, siendo en promedio $8.9\pm 0.6\text{mm}$ (línea punteada 2 negra). Durante este período la mosca defensora agitó sus alas en forma SWV mientras que el visitante pasó de tener sus alas arqueadas (AW) a tener sus alas en posición W (Figura 40 C-E).

Figura 40 M-Ñ: Se observó que la distancia promedio que inicialmente las separaba ($d_2 = 8.9\pm 0.6\text{mm}$, línea punteada roja) fue acortándose desde los 7.6mm hasta 7.4mm. En simultáneo, se pudo observar que el movimiento de alas del defensor pasó de ser SWV a WV y luego W, mientras que el visitante siempre las mantuvo en posición W.

Figura 40 Ñ-R: en esta secuencia de imágenes se detallan los eventos que ocurrieron en fracciones de segundo. La cámara de video permitió registrar hasta 25 cuadros por segundo. En estas imágenes se muestran los eventos ocurridos dentro del cuadro de video 1 al 5 pertenecientes al segundo 27. Se pudo observar que el defensor arremete contra el visitante golpeando con la parte anterior del cuerpo, principalmente cabeza y primer par de patas (Figura 40). La mosca visitante sale del territorio defendido en una fracción de segundo, quedando posicionada cerca de la base (Figura 40-S).

La Figura 40-T resume todos los cuadros anteriores (del A al S) formando una imagen superpuesta de los acontecimientos. La línea amarilla simboliza la trayectoria real descrita por el visitante, mientras que la celeste indica la del defensor. Se observa aproximación de las trayectorias de ambos contrincantes.

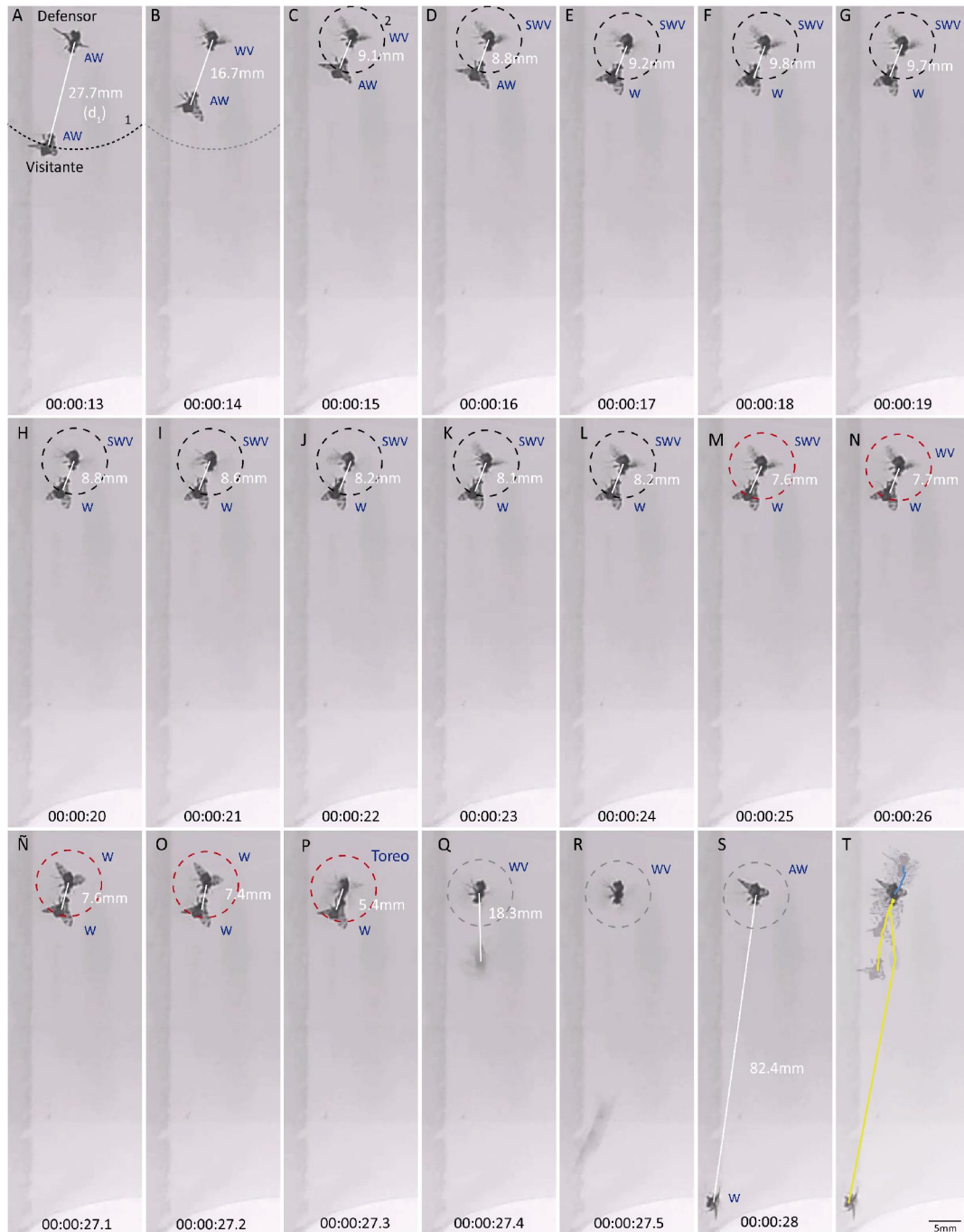


Figura 40. A-T: Fotograma que ilustra la secuencia completa de eventos en una situación de enfrentamiento con contacto físico en un lek experimental. Se muestran las imágenes capturadas desde que el defensor advirtió la presencia del invasor (A-B) hasta que éste se retiró del territorio defendido (R-S). En blanco se muestran las distancias que separaron a las moscas. D_1 = distancia umbral 1, D_2 =distancia umbral 2. En azul se indican los movimientos y posturas alares. W= alas montadas; AW=alas arqueadas; WV=wing vibration; W=wing. H: imagen montada a partir de los cuadros A-G, en línea punteada se muestran los límites de los umbrales 1 y 2. En amarillo se indica el desplazamiento real del invasor y en celeste el del defensor. Ver video anexo "video_suplementario_Figura40.avi".

Situación de "Pelea tipo 2":

Actitud del defensor: La mosca defensora realizó los mismos comportamientos que los descritos en situación de "Pelea tipo 1", sólo que luego de que el invasor traspasa la distancia umbral interna esta se lanzó sobre el visitante en posición de pseudo-cópula o "sometimiento", posándose sobre el dorso del visitante sujetándolo con sus 6 patas.

Actitud del visitante: La mosca visitante realizó los mismos comportamientos que los descritos en *Situación 1*, con la diferencia de que luego de atravesada la distancia umbral d_2 , el visitante fue "sometido" por el defensor.

Luego de la *Situación de "pelea tipo 2"*, se observó que:

- ambos machos aún tomados uno del otro por sus patas, caen o pueden caer a la base de la arena experimental. El tiempo que quedan unidos (mientras continúan con activo movimiento de patas y topeteo entre ellos) fue variable, con tiempos que fueron desde 2 segundos hasta casos extremos de 5 minutos. Al soltarse se observó que ambos machos pudieron eventualmente quedar en posición supina o sólo uno de ellos. Nunca se observaron situaciones donde ambos quedaron en posición prono.
- Solo uno de los machos, luego de estar tomado del otro en la zona de enfrentamiento, cae al fondo de la arena y queda en posición supina.

Como se detalló en las *situaciones de "Pelea tipo 1 y 2"*, se registraron eventos de caídas en posición supinas producto de una interacción previa. A este tipo de caída se las denominó **caídas supinas inducidas**.

Otro tipo de enfrentamiento macho-macho

Se observó otro comportamiento de interacción distinto entre defensor y visitante, distinto a los anteriores, siendo este tipo de enfrentamiento menos frecuente, sólo se observó en alrededor del 10% de los enfrentamientos con contacto físico. Este enfrentamiento se caracterizó por el golpe de alas entre los contrincantes luego de que el invasor traspasó la distancia umbral interna del defensor.

En la Figura 41 se muestra como el animal defensor se alineó con el visitante luego de que este último alcanzó el umbral de aproximación d_1 , que para este ejemplo fue de $d_1=13.5\text{mm}$. El defensor mantuvo las alas en posición AW y el visitante avanzó con las alas en AW hasta que al llegar a la distancia $d_2=7.9\text{mm}$ pasó al tipo W. Sin embargo, y a diferencia de los encuentros descritos anteriormente, en este tipo de enfrentamiento no ocurrieron aleteos, sino que por el contrario el visitante se aproximó rápidamente y sin pausa, y el defensor responde con un golpe de su ala izquierda y pata izquierda delantera (L1) al visitante. No se observó golpe con ala derecha, ni con pata derecha (D1).

En la Figura 42 se muestra el detalle del enfrentamiento posterior a los eventos de la Figura 42. Este tipo de enfrentamiento se caracterizó por ser muy rápido, los eventos transcurrieron en fracciones de segundos, resultando para este ejemplo 0.52 segundos (Figura 42 A-M). Principalmente se observó el rápido choque del ala izquierda del defensor sobre el lado derecho del cuerpo del visitante, evento que duró 0.12 segundos (Figura 42 C-E). En simultáneo se observó el contacto de la pata izquierda L1 con la región anterior del visitante. Este contacto fue más largo que el de ala, ya que se observó que la pata L1 permaneció en contacto más del doble de tiempo que el contacto de ala solo (0.28seg.)(Figura 42 C-J). El esquema Ñ y O de la Figura 42 muestra el avance conjunto del ala y pata L1 tanto en vista ventral como en vista lateral. Tras la interacción física, al igual que en los casos anteriores, se observaron casos donde uno de los dos machos cayó al fondo de la arena en la mayoría de los casos sobre sus patas (posición prono, Figura 39 A) y eventualmente en posición supina (Figura 39 B).

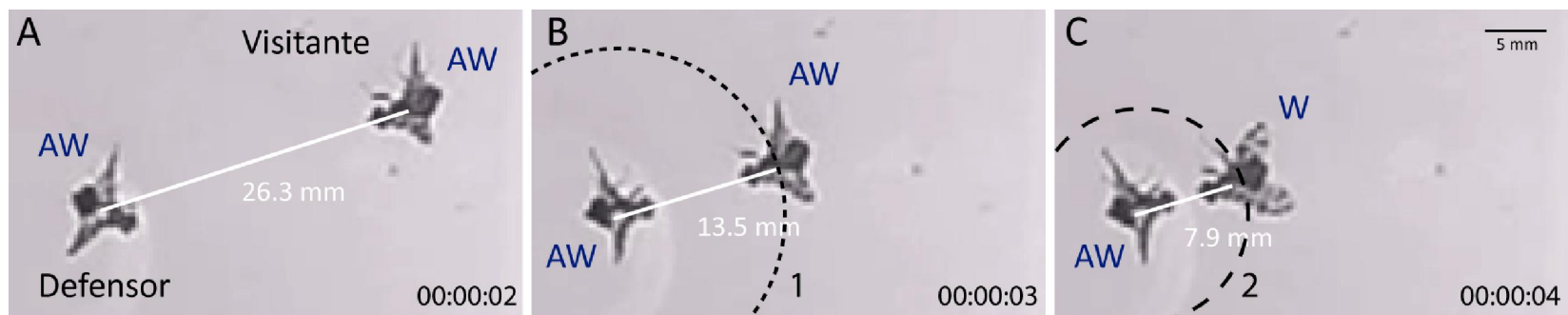


Figura 41. Aproximación previa al enfrentamiento con contacto físico. **A-B:** Se observa el estado de alerta de la mosca residente que defiende el pequeño territorio ante la llegada del visitante, ambos con posición de alas AW. **C:** distancia previa al contacto físico ($d_2=7.9\text{mm}$), el defensor mantiene sus alas en posición AW mientras que el visitante cambió AW por W. Línea punteada 1 simboliza la distancia d_1 . Línea punteada 2 representa la distancia d_2 . AW =arching wing, W=wing.

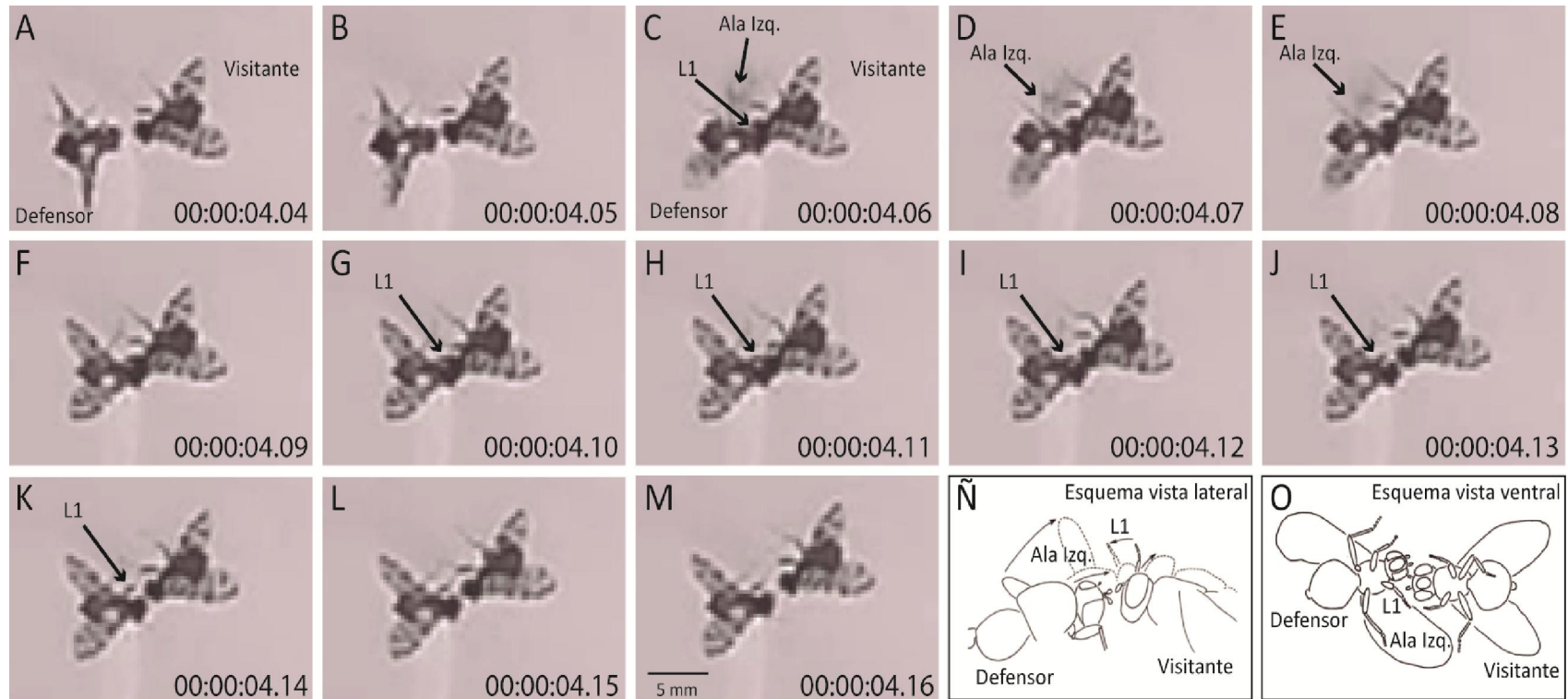


Figura 42. Detalle del Enfrentamiento posterior a los eventos de la Figura 41. Se observó el enfrentamiento con contacto físico con alas y patas en el lek experimental. **A-B** Fotograma que muestra la interacción física entre la mosca defensora y la mosca invasora en vista dorsal. **Ñ-O** Esquema que resume las principales observaciones de la pelea en el fotograma. L1= pata izquierda del primer segmento torácico. El tiempo esta expresado en fracción de segundos (apreciación de 25 cuadros por segundo).

5.4.5 Determinación de perfiles comportamentales predominantes en un lek.

No existen estudios que determinen perfiles diferenciales en *leks* naturales. En nuestro caso pudimos otorgar identidades diferenciales en *lek* de laboratorio. Los análisis de imágenes anteriores mostraron siempre enfrentamientos de a pares, que podían ser con o sin interacción física, donde una mosca “defiende” su pequeño territorio tras el avance de una mosca “visitante”. En estos análisis se detallaron los comportamientos del defensor y del visitante. Se observó que la mosca que fue defensora en un enfrentamiento, puede pasar a ser luego visitante del pequeño territorio de otro residente del *lek*. Lo mismo pasa con el “observador” que puede pasar a ser visitante o defensor.

Para estudiar el perfil comportamental predominante de cada mosca dentro del *lek*, se cuantificó el número de veces que se observó cada animal como “visitante” durante los 6 días de filmación (5to al 10mo) y luego se repitió el análisis como “defensor”. La tabla 3 (pág. 105) muestra el resumen de las observaciones obtenidas luego de la suma de los 6 días. A partir de estos resultados se elaboró un ranking de mayor, intermedio y menor de cada carácter, siendo:

- Visitante: V+++ (mayor); V++ (intermedio); V+ (menor)
- Defensor: D+++ (mayor); D++ (intermedio); D+ (menor)

La Figura 43 corresponde al análisis de la tabla 3, donde se observa el porcentaje de observaciones de moscas como visitantes o como defensoras, ordenadas según el ranking de perfil defensor o el de perfil visitante. Desde el punto de vista visitante, siempre hubo una mosca mayoritariamente visitante por sobre las demás ($p < 0,0001$). Se determinó que en el *lek* los machos de ranking “V+++” fueron un 20% más visitantes que los de categoría “V++” y un 40% mayor que aquellos machos de ranking “V+” (Figura 43 A). Mientras que en el análisis desde el punto de vista defensivo, siempre hubo una mosca dentro del *lek* mayoritariamente defensora ($p < 0,0001$). Se determinó que los machos de ranking “D+++” fueron un 27% más defensores que los de categoría “D++” y un 38.5% más defensores que aquellos machos de ranking “D+” (Figura 43 B).

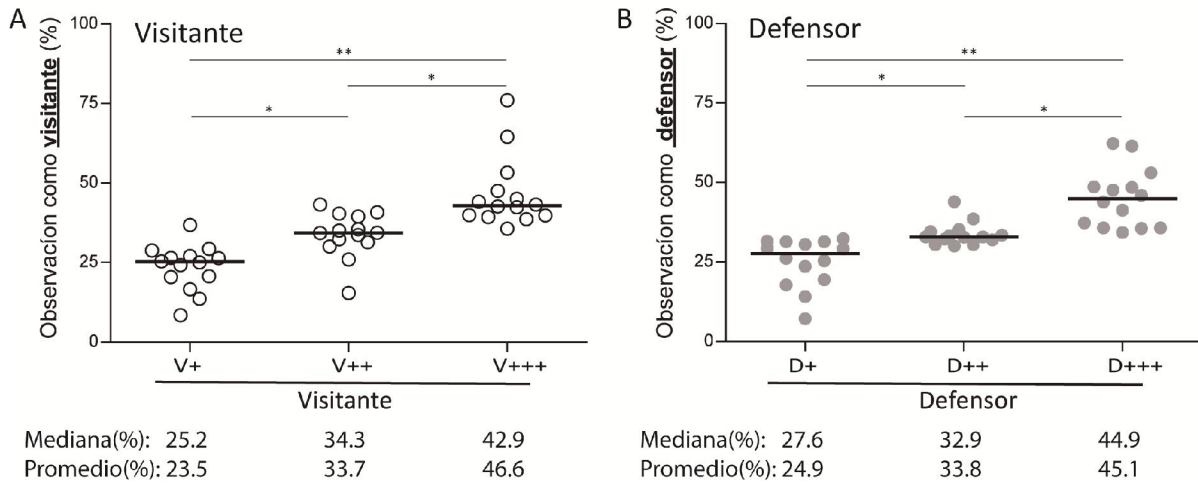


Figura 43. Porcentaje de observaciones de moscas en el lek con actitud visitante o defensor según el ranking de perfil Visitante (A) o defensor (B) luego del análisis acumulado de los 6 días de observación. La tabla debajo de cada gráfico indica el valor de la mediana y promedio de cada categoría. La barra negra horizontal en el gráfico marca la mediana. El asterisco indica que las medianas son significativamente diferentes ($P < 0.05$) test de Kruskal-Wallis.

La Figura 44 muestra un ejemplo de 3 experimentos, que formaron parte del análisis de la Figura 43, donde se grafican las observaciones conjuntas, desde el punto de vista visitante y defensor. Se observa que cada macho tiene la tendencia a exhibir un perfil predominantemente defensor, visitante o mixto. Por ejemplo en el experimento nro. 3, el macho #0 fue predominantemente defensor, el #1 resultó ser mixto y el #2 predominantemente visitante. En el experimento nro. 5 por el contrario el macho #0 resultó ser "mixto", el #1 defensor y el #2 visitante.

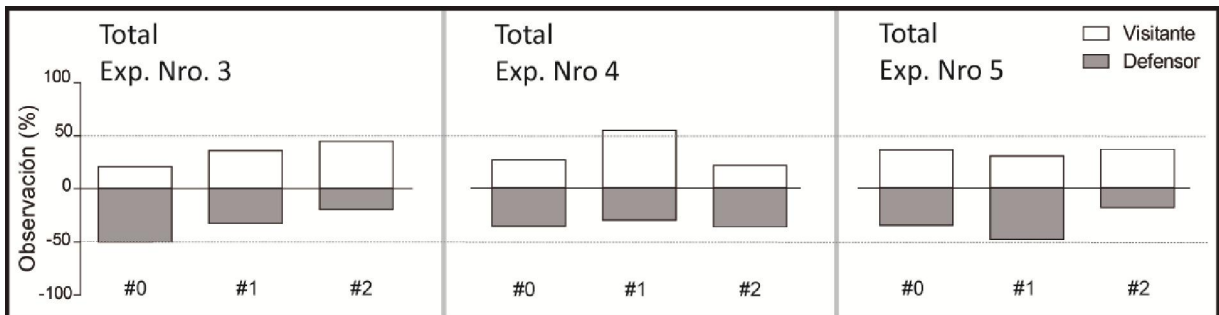


Figura 44. Perfil predominante de cada mosca en el lek experimental luego de la suma de eventos del 5to al 10mo día.

En la Figura 45 se reagruparon las observaciones defensivas ordenadas según las categorías de ranking visitante (Figura 45-A) y luego las observaciones visitantes para las categorías de ranking defensivo (Figura 45-B). El análisis global para todos los *leks* experimentales, demostró que las moscas que fueron mayoritariamente más visitantes (+++) fueron las menos defensoras (29.5%), mientras que aquellas menos visitantes (+) fueron las más defensoras (40.5%) (Figura 45-A). Por el otro lado los machos que fueron mayoritariamente más defensores (+++) resultaron ser los menos visitantes (29%), mientras que aquellos menos defensores (+) resultaron ser los más visitantes (43%) (Figura 45-B). En ambos casos de la Figura 45 se observó un grupo intermedio que se caracterizó por comportarse tanto defensor (34%) como visitante (35%).

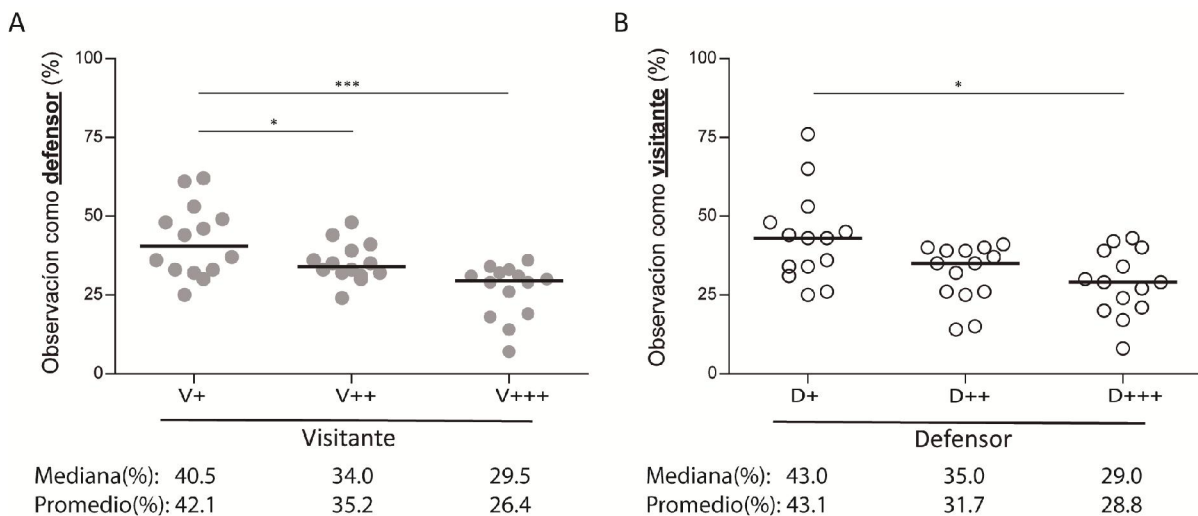


Figura 45. Porcentaje de observaciones de moscas en el lek analizadas según: **A.** observaciones defensivas porcentuales ordenadas por ranking visitante; **B.** observaciones visitantes porcentuales ordenadas por ranking defensor. La tabla debajo de cada gráfico indica el valor de la mediana y promedio de cada categoría. La barra negra horizontal en el gráfico indica la mediana. El asterisco indica que las medianas son significativamente diferentes ($P < 0.05$) test de Kruskal-Wallis.

Experimentos analizados	Mosca	Observaciones visitante	Porcentaje visitante	Ranking visitante	Observaciones Defensor	Porcentaje defensor	Ranking defensor
1	0	94	42	++	68	30	
	1	72	32	+	104	47	
	2	110	49	+++	104	47	
2	0	46	37		46	37	+++
	1	46	37		40	32	++
	2	32	26		38	31	+
3	0	59	20	+	140	49	+++
	1	102	35	++	92	32	++
	2	127	44	+++	56	19	+
4	0	70	26	++	95	35	++
	1	144	53	+++	79	29	+
	2	56	21	+	96	36	+++
5	0	67	35	++	66	35	++
	1	56	29	+	91	48	+++
	2	68	36	+++	34	18	+
6	0	80	32	++	83	33	++
	1	63	25	+	80	32	+
	2	105	42	+++	85	34	+++
7	0	104	34	++	125	41	+++
	1	80	26	+	77	25	+
	2	119	39	+++	101	33	++
8	0	63	27	+	107	46	+++
	1	80	34	++	55	24	+
	2	90	39	+++	71	30	++
9	0	63	26	+	78	33	++
	1	80	34	++	75	32	+
	2	95	40	+++	85	36	+++
10	0	18	8	+	113	53	+++
	1	162	76	+++	30	14	+
	2	33	15	++	70	33	++
11	0	45	25	+	54	30	++
	1	54	30	++	79	44	+++
	2	81	45	+++	47	26	+
12	0	168	43		122	31	+
	1	53	14		128	33	++
	2	168	43		139	36	+++
13	0	95	43	+++	16	7	+
	1	37	17	+	139	62	+++
	2	91	41	++	68	30	++
14	0	88	39	++	108	48	+++
	1	106	48	+++	70	31	+
	2	82	37	+	98	44	++
15	0	144	65	+++	65	29	+
	1	54	24	+	137	61	+++
	2	90	40	++	86	39	++
16	0	47	40	+++	38	32	++
	1	37	31	++	36	31	+
	2	34	29	+	44	37	+++

Tabla 3. Resumen de las observaciones obtenidas luego de la suma de los 6 días de análisis. Se asignó una categoría de: “+++”, “++” y “+” según el valor proporcional del perfil por arena experimental. Si el valor proporcional fue similar no se estableció ranking.

5.4.6 Caídas en el lek experimental

Entre de los comportamientos detallados dentro del *lek* se registraron eventos de caída. Como se especificó en las interacciones con contacto físico se registraron eventos de caídas, a las cuales llamamos caídas inducidas (Figura 46, llave 1.) Sin embargo, en el *lek* identificamos otra forma de caída que ocurren de manera espontánea, sin que medie interacción con otras moscas, a las cuales llamamos caídas espontáneas. (Figura 46, llave 2.).

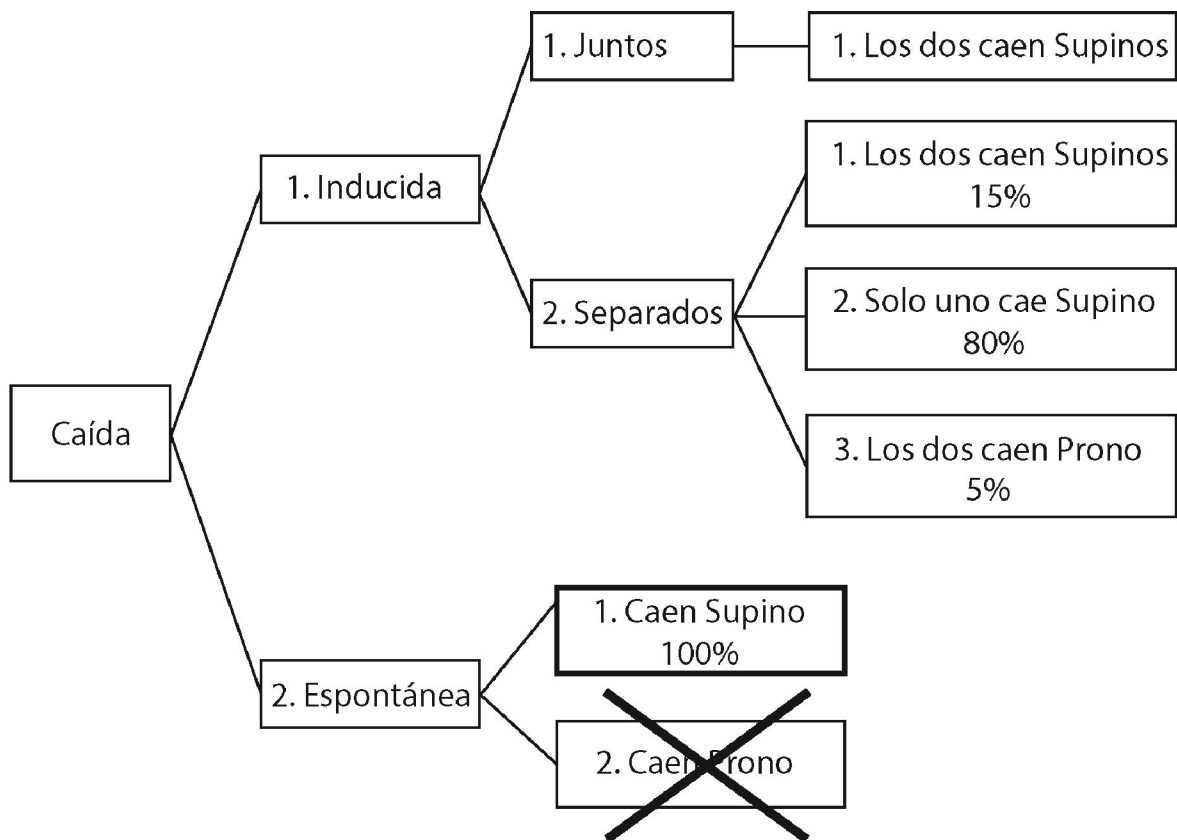


Figura 46. Gráfico resumen de tipo de caídas registradas durante el *lek* experimental de *C.capitata*.

Luego de la interacción macho-macho ocurrió que ambos machos cayeron juntos tomados uno del otro al fondo de la arena (Figura 46, llave 1.1) o separados uno del otro (Figura 46, llave 1.2) (ver "pelea tipo 1" pág. 94 y "pelea tipo 2" pág. 98). En el caso de las

caídas juntos, siempre se observó que cayeron sobre su dorso y luego al separarse recuperaron la posición prono. En los casos donde cayeron separados uno del otro se observó que: (1.2.1) en el 15% de los casos ambos machos cayeron en posición supina; (1.2.2) en aproximadamente el 80% de los casos uno de los dos machos cayó en posición supina mientras que el otro cayó en posición prono, y (1.2.3) alrededor del 5% restante de los casos los dos cayeron en posición prono.

Inesperadamente se observó que dentro del lek ocurrieron caídas espontáneas, estas fueron caídas sin interacción previa donde el macho cayó al fondo de la arena. Lo que resultó aún más interesante es que todas las caídas espontáneas fueron supinas, no se registraron eventos de caídas prono (Figura 46, llave 2.1). En el capítulo siguiente se estudiará la asociación entre las caídas espontáneas y el perfil predominante de cada macho dentro del lek.

5.5 Conclusiones y discusión

Por primera vez se recreó un *lek* de dípteros en el laboratorio en una arena experimental *ad hoc* construida especialmente. No hemos encontrado en la literatura una referencia a un *lek* en condiciones de laboratorio para ningún insecto. En general se utilizan condiciones semi-naturales como carpas o redes en plantas al exterior, focalizándose principalmente en el apareo (Arita H. & Kaneshiro, 1985; 1988).

En nuestro *lek* experimental se pudieron analizar todos los comportamientos, en particular reconocer los patrones comportamentales descritos en la naturaleza; tanto para *Ceratitis capitata* como para otras moscas (tabla 4). La observación de los comportamientos nos permitió la validación del *lek* experimental como similar al de la naturaleza en cuanto a patrones de comportamiento individual.

Comportamiento asociado a la agresión	Denominación en inglés	Esta tesis <i>Ceratitis</i>	Arrita y Danesito (1988) <i>Ceratitis</i>	Briceño y Eberhard (1999) <i>Ceratitis</i>	Benelli et al. (2015) <i>Ceratitis</i>	Nilsen et al. (2004) <i>Drosophila</i>
Alas plegadas (reposo)	Wing folded	X	X	X	X	X
Alas arqueadas (perpendiculares al cuerpo)	Arching wings	X	X	X	X	X
Agitación de alas	Wave wings	X	X	X	X	
Ataque con las alas	Wing strike	X	X	X	X	
Vibración corta de las alas	Short wing vibration	X		X		
Golpe con las patas delanteras	Tap with front legs	X		X	X	X
Sacudón con el cuerpo	Body jerk	X		X		X
Exposición de piezas bucales	Labelar display			X	X	
Golpe con la cabeza	Push with head and mouthparts	X	X	X	X	X

Tabla 4. Tabla comparativa de comportamientos en la interacción macho-macho de *Ceratitis* y *Drosophila*.

En cuanto a los estudios de laboratorio, si bien existían estudios previos en la interacción de machos de *C. capitata* estos fueron realizados en arenas en dos dimensiones y sólo se estudió la interacción de dos moscas macho, por lo que estos estudios no podían asimilarse a situaciones de *lek* (Benelli, 2014a; b; Benelli et al., 2015a; Benelli et al., 2015b; Shelly, 2000; 2001; Shelly & Whittier, 1997). Elegimos la condición de *lek* con 3 moscas ya

que corresponde al *lek* mínimo observado en la naturaleza. Fue una situación experimental simple, óptima para la identificación y seguimiento de individuos en la arena experimental. Para llegar a esta configuración final, se realizaron varios *leks* prototipos de 4, 5 y 6 moscas en la misma arena experimental que se detalló en este capítulo, sin embargo la identificación individual y posterior análisis fue muy dificultosa. Por otro lado se estudiaron prototipos de arenas más grandes para albergar densidades mayores de moscas, pero el aumento de superficie de la arena conllevó a una pérdida de resolución de imagen de video, perdiendo los detalles de la interacción macho-macho y dificultando la identificación de los individuos.

Por primera vez se detectaron y caracterizaron perfiles dominantes durante el *lek* en *C. capitata*. Nuestros estudios demostraron que durante el *lek* existen tres diferentes perfiles comportamentales, predominantes entre los tres residentes, siendo estos: (i) residente invasor, (ii) residente defensor y (iii) mixto. El *lek* estudiado en el laboratorio es un *lek* "obligado" de tres machos, ya que desde el 4to día de edad hasta el último día de videograbación son siempre los mismos. Esto difiere a lo que ocurre en la naturaleza donde cada día el *lek* se arma a media mañana y desarma al atardecer (Arita H. & Kaneshiro, 1985).

Si bien este análisis secuencial de un mismo grupo de insectos no es lo habitual, el *lek* artificial permitió revelar diferentes perfiles. Estas diferencias podrían ser reveladoras de microheterogenidad genética en la población, sumado a factores de desarrollo larval y experiencias previas al 4to día de iniciación del *lek* experimental. Al tratarse de un grupo de machos, en ausencia de hembras los comportamientos no son influenciados por la presencia de estas durante el *lek*. Por lo tanto, nuestro *lek* es equivalente en la naturaleza previamente a la llegada de hembras.

Determinamos que las interacciones durante el *lek* siempre ocurren de a pares, quedando un tercero "expectante". En la naturaleza el *lek* ocurre en las hojas y/o fruto del árbol hospedero y las interacciones entre machos también son de a pares quedando el tercero distante de la interacción y/o pelea macho-macho. Estos pueden o no estar

exponiendo gota de feromona en la punta del abdomen que atrae a las hembras (Arita H. & Kaneshiro, 1989; Benelli, 2014a).

Determinamos que las peleas siempre fueron producto de que un macho se desplazara por la arena con "actitud visitante" en territorios de otros machos residentes. La respuesta del macho visitado, al que llamamos "residente defensor" determinó dos umbrales de aproximación. El comportamiento de alerta de un residente "defensor" determina un umbral 1 (d_1), que correspondió para cada caso, al límite máximo de acercamiento sin reacción del defensor y un umbral 2 (d_2), límite máximo de acercamiento de la mosca invasora sin interacción física entre ambos contrincantes. Varios autores hasta el momento han descrito "acciones agresivas" entre machos de *C. capitata* (Arita H. & Kaneshiro, 1985; Benelli, 2014a; Benelli et al., 2015c; Prokopy & Hendrichs, 1979). Sin embargo esta es la primera vez que se reporta una medición precisa de los eventos de interacción durante el *lek* de *Ceratitidis*, lográndose medir por primera vez umbrales de comportamiento, por aproximación a cada residente defensor.

En varias especies animales, la experiencia agresiva influye en las características y los resultados de los conflictos posteriores, de modo que los ganadores tienen más probabilidades de volver a ganar (el efecto ganador) y los perdedores tienen más probabilidades de volver a perder (el efecto perdedor) (Benelli et al., 2015a; Hsu et al., 2006). Este fenómeno se ha observado en numerosos insectos como ser la mosca *D. melanogaster*, grillos, avispas e incluso vertebrados (Goubault & Decuignière, 2012; Iwasakiandast et al., 2006; Rutte et al., 2006; Yurkovic et al., 2006). Estudios previos de Benelli y colaboradores (2015 a,b) en los géneros *Ceratitidis* y *Bactrocera*, establecieron que en las interacciones macho-macho el ganador de una pelea tiene altas chances de ganar en una siguiente contienda; interpretando al "ganador" como aquel que queda en la posición donde ocurrió el encuentro desplazando al contrincante. Esto no ha sido observado en nuestro *lek*. Sin embargo, Benelli observó que si un macho fue desplazado en sucesivas ocasiones en diferentes contiendas, éste no quedó rezagado, sino que vuelve a confrontar con los machos. Estas observaciones si concuerdan con nuestros descubrimientos. Estos enfatizan la prevalencia de perfiles predominantes de cada una de las moscas dentro del

lek, donde se observó que siempre hubo un macho que se comportó predominantemente defensor, mientras que otro, que visitó los distintos territorios de los residentes del lek experimental fue predominantemente visitante y el tercero tuvo comportamiento intermedio.

Durante los eventos de aproximación y enfrentamientos observamos una gran variedad de movimientos alares, lo cual destaca la importancia de estos apéndices en la interacción macho-macho. Los tefrítidos en general se caracterizan por patrones de colores y manchas en sus alas (Thompson & Society, 1998). Se ha descrito que la coloración de sus alas forman parte de señales visuales importantes en la comunicación intraespecífica e interespecífica (Aluja & Norrbom, 1999; Burk, 1981; Rao N., 2012). En el capítulo anterior demostramos que la maduración de la coloración marrón de las manchas de las alas de los machos continúa aún luego del 4to día de edad del adulto.

En nuestros experimentos fue evidente la importancia de las diferencias en los patrones de caídas de cada mosca en el *lek*. Se registraron eventos de caídas producto de una interacción previa. A este tipo de caída se las denominó **caídas inducidas**, para diferenciarlas de las **caídas espontáneas**, que también se observaron en el *lek* y que como se ve más adelante resultaron muy importantes. Las caídas inducidas fueron prono o supinas, sin embargo todas las caídas espontáneas fueron en posición supina. Esta particularidad de las caídas espontáneas fue de especial interés en esta tesis ya que revelaría un desbalance "normal" y esporádico de la homeostasis del sistema nervioso en cuanto a la coordinación de movimiento en el espacio tridimensional. La caída espontánea involucraría la descoordinación de 2 o más eventos: 1- el desprendimiento de las patas de las paredes de la arena experimental y 2- la imposibilidad de corregir la orientación en el espacio en el transcurso de tiempo de caída hasta llegar al suelo. Normalmente, este patrón se observa en moscas de avanzada edad pero mucho menos en moscas jóvenes como las estudiadas en el *lek*. Las moscas en general realizan maniobras para el aterrizaje y/o despegue que involucran la sincronización del movimiento de las patas con el movimiento rotacional del cuerpo en el espacio (Hyzer, 1962; Liu et al., 2019; Sane et al., 2018). De los movimientos en el espacio tridimensional de estos insectos, la rotación sobre

el eje antero-posterior es la más sensible a pequeños cambios en el movimiento (llamado alabeo o "roll" en inglés en notación Euler) (Beatus et al., 2015; Combes & Dudley, 2009; Ravi et al., 2013). Los movimientos tridimensionales requieren de una rápida respuesta muscular (principalmente músculos torácicos) que están sincronizados por un circuito nervioso complejo, que según los modelos actuales en dípteros involucra a la cabeza (interneuronas visuales), sensilias alares y sensilias en halterios (Bartussek & Lehmann, 2016; 2018; Strausfeld & Gronenberg, 1990). Por lo tanto la caída supina espontánea evidenciaría una descompensación sutil neuro-motora que desencadena un desarreglo en la integración del espacio tridimensional de la mosca.

Capítulo 6

El fenómeno de caídas supinas como posible indicador fisiológico

6.1 Introducción

En el capítulo 5 se describió por primera vez el desarrollo de *leks* experimentales en *C. capitata*. Esta innovación permitió poder estudiar diferentes comportamientos y asociarlos a la senescencia y longevidad. Dentro de esta situación particular demostramos que no solo se generan caídas inducidas por las peleas sino que también muchas más frecuentes caídas espontáneas. Las diferencias en la frecuencia de caídas aparecían como un posible indicador del estado fisiológico del individuo; resultado de mayor interés cuento más joven es este.

Un biomarcador de deterioro es un parámetro comportamental o molecular de un organismo que eventualmente, puede permitir estimar el riesgo de mortalidad a una edad más avanzada (Markowska & Breckler, 1999; Xia et al., 2017).

En relación a las caídas, se ha observado en *C. capitata* un comportamiento muy particular visualizable en animales jóvenes y que es típico en aquellas moscas que están próximas a morir y fue llamado “comportamiento supinación” (posición invertida sobre su dorso) por Papadopoulos et al. (2002). Estos autores observaron que machos relativamente jóvenes que permanecían en posición supina por un tiempo mayor o igual a dos segundos se asemejaban a moscas moribundas o muertas. Sin embargo, cuando estas moscas se incorporaban a su posición normal eran indistinguibles del resto de la población. Es entonces que con el fenómeno de “supinación” se nos presentó la posibilidad de estudiar un potencial biomarcador del estado general de la mosca modelo *C. capitata*. Totalmente inexplorado en su fisiología como en sus bases bioquímicas y moleculares.

El problema de la senescencia en relación al estado funcional

La senescencia es un fenómeno biológico complejo que puede ser definido como el deterioro progresivo del estado fisiológico de un individuo, que culmina en la muerte (Flatt & Partridge, 2018). Si bien es un tema que ha suscitado gran interés desde hace muchos años, la mayoría de los estudios sobre envejecimiento se centraron en procesos que regulan la duración de la vida (Burger et al., 2007; Grotewiel et al., 2005). La senescencia

demográfica se basa en la medición de la longevidad de un grupo de individuos bajo determinadas condiciones ambientales (Helfand & Rogina, 2003), obteniéndose la correspondiente expectativa de vida para una especie en un ecosistema determinado. Desde el punto de vista fisiológico la senescencia puede visualizarse como un deterioro múltiple de las funciones corporales. En general se asume que hay correlación entre senescencia funcional y demográfica; sin embargo hay trabajos que cuestionan esta idea (Burger & Promislow, 2006). En algunos casos de insectos sociales como abejas, parece existir un desacople entre edades cronológica y fisiológica y por tanto existiría la posibilidad de que la senescencia funcional y la longevidad fueran parcialmente independientes (Amdam & Page, 2005; Heinze & Schrempf, 2008; Rueppell et al., 2007). El análisis del acortamiento o extensión de la vida en diferentes condiciones es importante para ciertos aspectos del proceso de envejecimiento, no provee información directa sobre las causas que llevan a la muerte.

Estudios recientes comenzaron a enfocarse en aquellos procesos que determinan el deterioro del estado funcional como consecuencia de la edad y de la historia de vida de cada individuo. Este concepto ha sido denominado como senescencia funcional (Grotewiel et al., 2005). Si bien, para cada individuo, la esperanza de vida depende del deterioro funcional global, no parece existir una linealidad entre las alteraciones y/o daños registrables a nivel celular y funcional en cada uno de los tejidos por un lado y la muerte por el otro. Todo indica que existen diferentes umbrales para la pérdida de funcionalidad de cada tejido y que a su vez el umbral de incapacidad o muerte podría alcanzarse por diferentes vías de deterioro (Münch et al., 2008; Simon et al., 2006). En este sentido resulta importante determinar cuál es, de existir, la correlación cuantitativa y/o cualitativa en el deterioro celular y tisular entre diferentes órganos y funciones, tanto en condiciones consideradas normales como en condiciones inusuales de alteración del medio externo o interno.

En invertebrados, los principales modelos utilizados para el estudio de la senescencia son la mosca del vinagre *Drosophila melanogaster* y el nematodo *Caenorhabditis elegans*

(Antebi, 2007; Gaitanidis et al., 2019; Gems & de la Guardia, 2013; Piper et al., 2008), pero importantes aportes han sido obtenidos estudiando la mosca mediterránea *C. capitata* (Carey, 1997; 2011; Novoseltsev et al., 2005; Yap et al., 2015). Aunque también existen varios trabajos en otros insectos, especialmente en insectos sociales (de Verges & Nehring, 2016; Murthy & Ram, 2015; Rueppell et al., 2007; Zajitschek et al., 2019). Hay gran cantidad de trabajos que correlacionan el estado funcional real de un insecto o grupos de insectos con parámetros moleculares, pero por un lado las posibles predicciones en cuanto a la longevidad, sólo pueden aplicarse al resto de los individuos en iguales o muy similares condiciones y por otro se requiere sacrificar a los animales experimentales. Así en estudios metabólicos, para detectar pequeños cambios suelen sacrificarse gran cantidad de insectos (Kapranas et al., 2016).

Patrones moleculares pueden revelar el estado fisiológico de un insecto, permitiendo correlacionarlo con parámetros fisiológicos. Por ejemplo, en nuestro laboratorio se encontró que los patrones lipídicos de las moscas *C. capitata* pueden ser utilizados para construir índices que sirven como indicadores del estado funcional de los individuos, pudiendo discriminar entre poblaciones mantenidas bajo diferentes condiciones de temperatura (Pujol-Lereis et al., 2016; Pujol-Lereis et al., 2014; Pujol-Lereis et al., 2012).

Una amplia gama de comportamientos en insectos adultos pueden ser analizados cuantitativamente en el laboratorio (Connolly, 1998). Al igual que otros animales, las moscas de edad adulta pierden progresivamente funciones como ser la locomoción, el olfato, el aprendizaje y la ritmicidad circadiana (Tabla 5). No todos los comportamientos declinan a la misma velocidad y algunos no parecen modificarse en absoluto, al menos durante las primeras semanas de vida. Esta heterogeneidad en diferentes aspectos de la senescencia funcional indicaría que los cambios en el comportamiento relacionados con la edad podrían ser causados por déficits funcionales parciales, en órganos específicos, eventualmente muy sutiles y difíciles de detectar, por contraste con un deterioro fisiológico generalizado. La Tabla 5 muestra algunos patrones comportamentales dependientes de la edad cronológica, que delatan un deterioro anticipado, asociado a la edad. Es importante destacar que casi todos los trabajos mencionados en la Tabla 5 fueron encarados desde el

punto de vista biológico-comportamental sin profundizar en estudios moleculares y/o bioquímicos.

Patrón comportamental	Principales efectos observados con aumento de la edad	Referencia
Geotaxis Negativa	Aumento del tiempo requerido para la respuesta. Reducción de la actividad locomotora durante el tiempo del ensayo	Gargano et al. (2005)
Actividad exploratoria	Menor movimiento desde el punto de liberación. Las moscas se alejan a menor distancia.	Le Bourg (1999)
Respuesta fototáctica	Reducción de la respuesta.	Leffelaar and Grigliatti (1983)
Vuelo	Reducción del tiempo de vuelo	Leffelaar and Grigliatti (1983)
Reproducción de machos	Reducción del número de sucesos de cópula	Miquel et al. (1976) C. Economos et al. (1979)
Reproducción de hembras	Reducción del número de huevos Reducción de la fertilidad	David et al. (1975)
Reposo no circadiano	Reducción del reposo durante la noche	Shaw et al. (2000)
Inmunidad innata	Inducción incrementada de dipterina	Zerofsky et al. (2005)
Resistencia a estrés	Reducción de la resistencia a estrés térmico Reducción de la resistencia a estrés oxidativo. Reducción de la resistencia al estrés de ayuno Reducción de la resistencia al estrés de desecación	Bonilla et al. (2002) Minois and Le Bourg (1999) Nghiem et al. (2000)
Sueño	Pérdida de plasticidad	(Donlea et al., 2018)

Tabla 5. Cambios dependientes de la edad cronológica de *Drosophila melanogaster* estudiados en diferentes sistemas y funciones.

6.2 Objetivo principal

El objetivo en esta etapa de la tesis fue el estudio en detalle del evento de caída en posición supina en insectos jóvenes dentro del *lek*; y explorar su eventual relación con otros parámetros fisiológicos estudiados.

6.3 Resultados

En el capítulo 5 vimos que en el *lek* se generan caídas inducidas por las peleas pero que existen también caídas espontáneas.

6.3.1 Eventos supinos observados durante el *lek*.

Como mencionamos anteriormente, hemos detectado en el análisis de caídas en el *lek* experimental, eventos de caída en posición supina. La supinación es la posición invertida de la mosca con su dorso sobre el sustrato y las patas en el aire. Generalmente, las moscas luego de caer sobre su dorso inmediatamente vuelven sobre sus patas (menos de 2 segundos). Para el recupero de la posición utilizan el aleteo rápido de sus alas, seguido del movimiento de patas.

Obviamente al existir caídas espontáneas e inducidas en general, detectamos dos tipos de caídas en posición supina:

- Caídas supinas inducidas: fueron aquellas caídas en posición supina producto de una interacción física macho-macho previa. Luego de la pelea, uno o ambos machos cayeron en posición invertida sobre fondo de la arena. Hubo casos en que ambos machos cayeron, tomados uno del otro por las patas, al fondo de la arena y luego, uno o ambos, quedaron en posición supina.
- Caídas supinas espontáneas: fueron aquellas caídas en posición supina donde el macho cayó al fondo de la arena, desde cualquier ubicación del *lek*, sin ninguna interacción previa (evento individual y espontáneo).

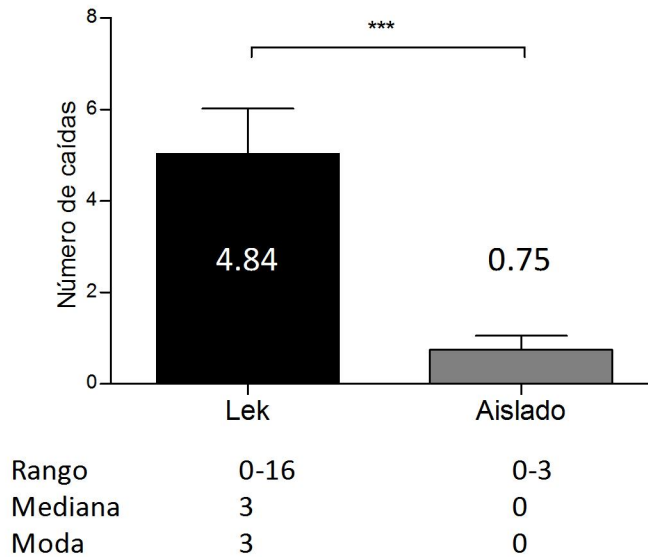


Figura 47. Número de caídas espontáneas promedio en posición supina en el lek vs animales aislados. (***) $p < 0.001$, GLM – Poisson).

Se analizaron en total 475 eventos de caída en posición supina en el lek experimental. En 232 eventos (48.8%) fueron caídas supinas espontáneas, y los 243 eventos restantes (51.2%) fueron caídas inducidas.

Como era de esperar los machos dentro del lek experimental tuvieron un mayor número de caídas espontáneas que aquellos machos mantenidos en la misma arena en solitario ($p < 0.001$). En la Figura 47 se observa que en promedio las moscas del lek tuvieron 4.84 caídas supinas (rango desde 0 hasta 16 caídas), mientras que las aisladas, como era de esperar por su menor movilidad, tuvieron en promedio 0.75 caída supinas (rango de caídas desde 0 hasta 3 caídas). Estos datos permitieron estimar, dentro de las caídas espontáneas en el lek cuantas podrían ser independientes de agrupación, es decir en promedio 0.75 de 4.84 (15%) (Figura 47).

6.3.2 Características temporales de las caídas en posición supina.

Dentro de los distintos comportamientos estudiados observamos que algunas de las moscas al caer en posición supina, recuperaron su posición prono en forma inmediata o demoraron varios segundos.

Para determinar la frecuencia de los distintos tiempos en que la mosca permaneció en posición supina luego de caer se analizaron todas las caídas registradas en los 16 *lek* experimentales validados (475 caídas en posición invertida). Interesantemente, en la Figura 48-A, se puede observar que, en general, hubo dos rangos de tiempo de recupero de la posición supina mayoritarios; el primero (más frecuente) fue el más rápido, correspondiente al rango 0-0.99 segundos, con una frecuencia de 40.1%, y el segundo (un poco más lento) correspondiente al rango de 2-2.99 segundos, con una frecuencia de 25.1%.

Los dos rangos que siguieron en frecuencia fueron el de 1-1.99 segundos con 12.7% y el de 3-3.99 segundos con 12.1%. Sorpresivamente se registraron machos en posición supina con tiempos muy prolongados, del orden de los 14 segundos (rango 14-14.99), aunque fueron minoritarios (1%) (Figura 48-A).

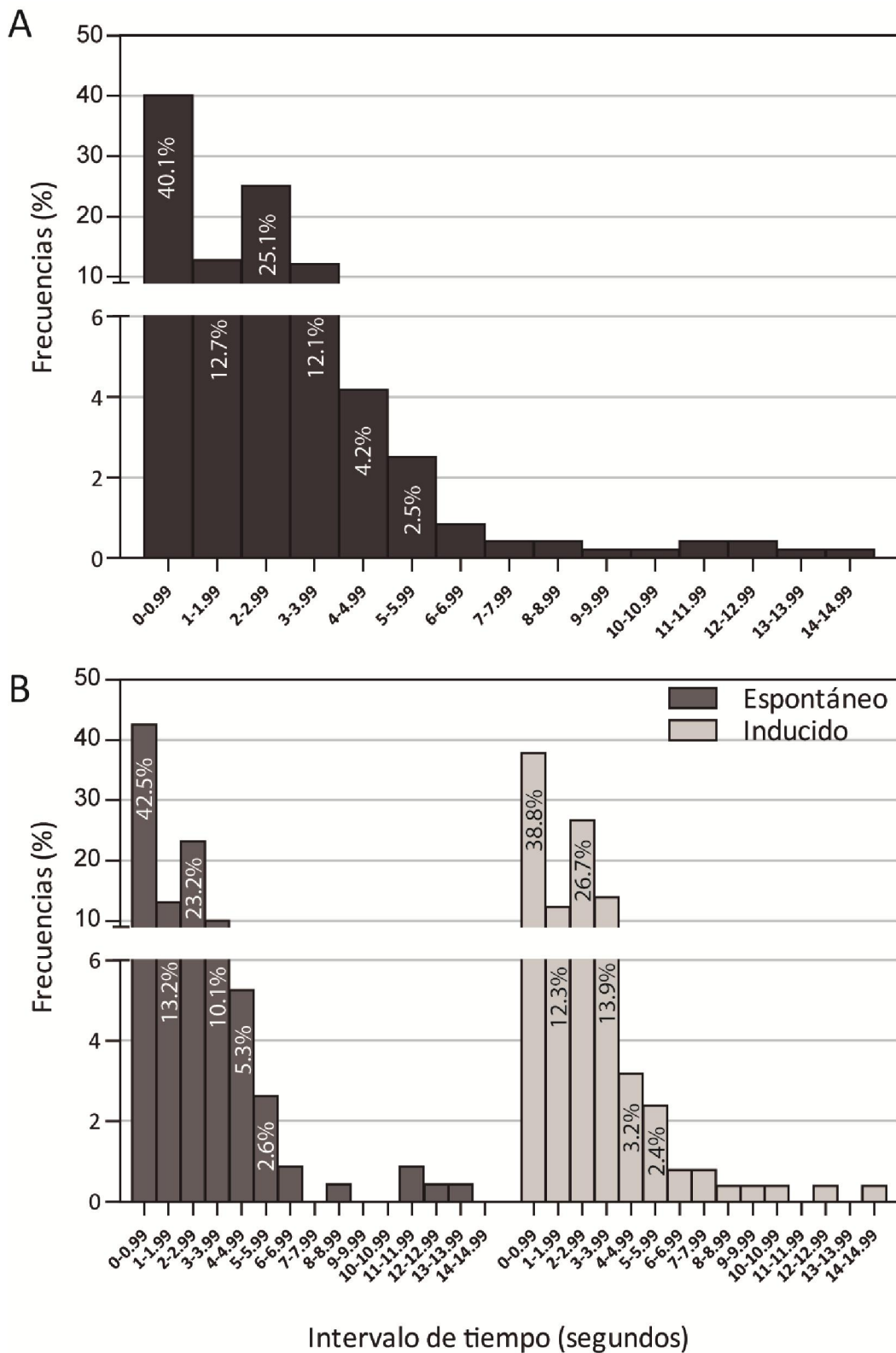


Figura 48. Frecuencias de tiempos en posición supina. **A.** Frecuencias de tiempos en posición supina total. **B.** Frecuencias de tiempos en posición supina según origen espontáneo o inducido.

En el panel B de la Figura 48 se muestra como se desdobló la frecuencia de tiempos para los dos sucesos de caída (espontánea e inducida). Se registraron en total 228 caídas supinas espontáneas y 251 caídas supinas inducidas. Ambos diagramas de frecuencias tienen dos picos máximos, el primero correspondiente al rango de tiempo 0-0.99 (rápido) y el segundo correspondiente al rango 2-2.99 segundos. Sin embargo se observó que el rango 0-0.99 segundos (tiempos casi instantáneos) tuvo mayor frecuencia en las caídas de origen espontáneo (42.5% espontáneos vs. 38.8% inducidas), mientras que la frecuencia de 2-2.99 segundos fueron ligeramente mayor en las inducidas (23.2% espontáneos vs. 26.7% inducidas). Por otro lado, el gráfico de distribución de frecuencias que corresponde a eventos espontáneos, tiene mayor número de observaciones en rango de tiempo altos (4-4.99 con 5.3% y el 5-5.99 con 2.69%) en comparación a la distribución de inducidos (4-4.99 con 3.2% y el 5-5.99 con 2.4%).

En función de los resultados anteriores se decidió concordar con Papadopoulos et al. (2002), definimos al recupero lento cuando el tiempo de recupero fue mayor o igual a 2 segundos y recupero rápido cuando el tiempo fue menor a los 2 segundos.

Significativo desde el punto de vista comportamental, aquellos machos que demoraron más tiempo (2 o más segundos) emplearon una combinación de aleteos con intervalos donde se observó el movimiento de patas (principalmente el 3er par de patas), sin embargo aquellos machos que demoraron excesivamente (tiempos del orden de 10 segundos o más) emplearon el tercer par de patas como “brazo de palanca” contra el suelo y volver a la posición prono. Los machos que se recuperaron rápidamente de la posición supina emplearon un rápido aleteo.

Análisis del tiempo de recupero

El número de caídas supinas espontáneas, tanto con recupero lento como rápido, presentaron una alta asociación positiva entre ellas (coeficiente de Pearson 0.67, Figura 49), siendo entonces el tiempo de recuperación de la caída aparentemente indistinto como subcategoría de la caída espontánea. Este resultado indicaría que lo relevante fue el número de eventos de caída espontánea supina en sí mismo y no el tiempo de recupero.

Por otro lado el mapa de correlación mostró dos grupos nuevamente fue el mencionado de caídas supinas espontáneas y otro que agrupa a las caídas supinas inducidas (Figura 49).

En la Figura 49 se puede observar la matriz 4x4 estandarizada para las variables:

- caída supina inducida recuperación lenta;
- caída supina inducida recuperación rápida;
- caída supina espontánea recuperación lenta;
- caída supina espontánea recuperación rápida.

El determinante de una matriz estandarizada puede tomar valores entre 0 y 1; donde el valor de determinante próximo a cero indica redundancia, mientras el valor próximo a 1 indica independencia de variables. El determinante de la matriz estandarizada fue de 0.43 lo cual indicó redundancia de datos. Tras este análisis, se decidió sumar los grupos caídas supinas inducidas de recuperación lenta y rápida, y lo mismo para caídas supinas espontáneas lenta y rápida.

El determinante de la nueva matriz estandarizada con las variables:

- caída supina inducida;
- caída supina espontánea,

fue de 0.99 lo cual indicó una alta independencia de las variables caída espontáneas e inducidas.

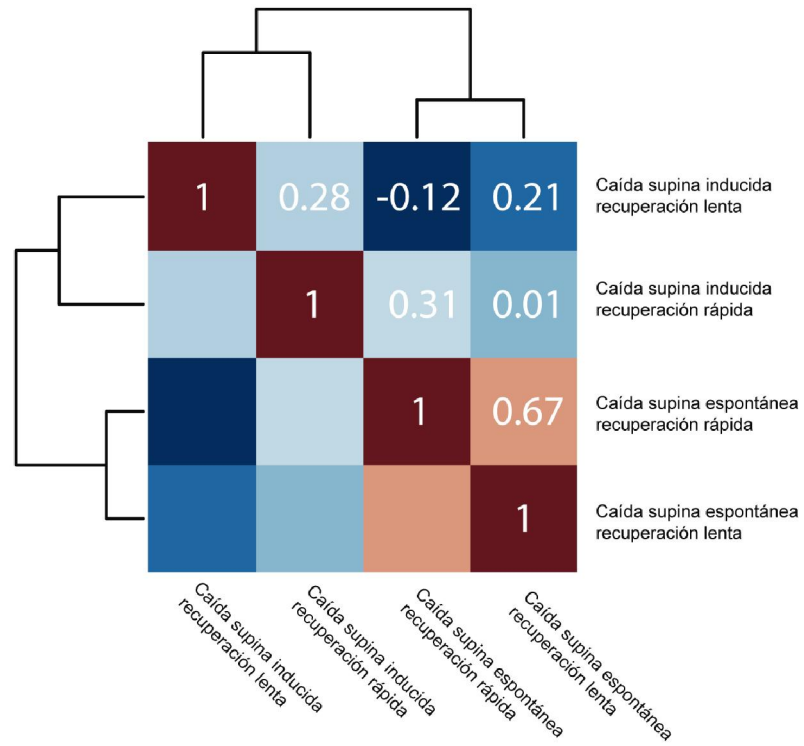


Figura 49. Mapa de calor, muestra los grupos formados a partir de las correlaciones de variables. Sobre la diagonal superior muestra los coeficientes de correlación de Pearson. Al ser una matriz de correlación relativa, la diagonal toma valor de 1.

6.3.3 Estudios de longevidad

Luego del periodo de observación y registro de los eventos durante el *lek*, se mudaron los individuos a un frasco de igual volumen que el del *lek* experimental (sin anestesia y con la ayuda de la aspiradora) para colocarlos en cámara de cría, donde se registró la mortalidad (Figura 50).

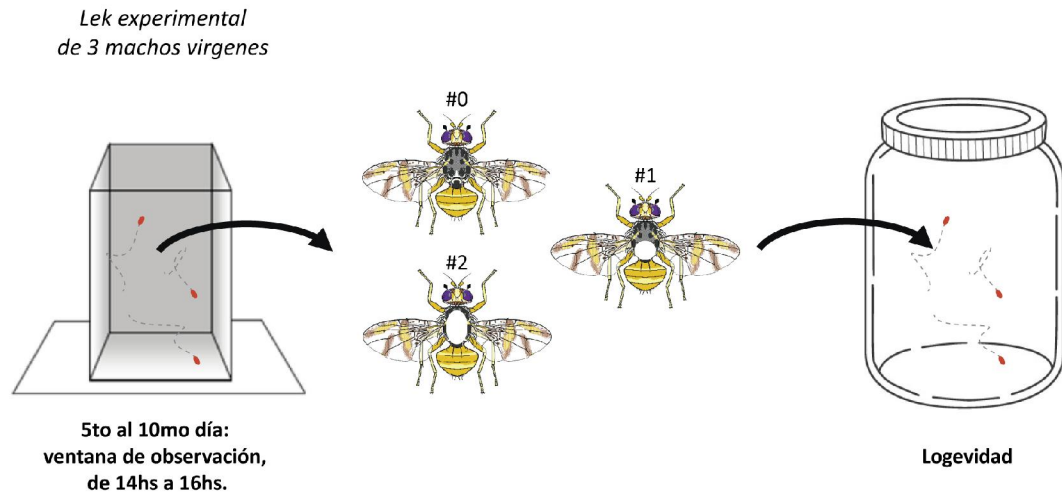


Figura 50. Luego del período de observación de actividades, los machos de cada *lek* experimental fueron cambiados a un recipiente de igual volumen que el *lek* y se registró la mortalidad de los individuos. En controles, se mantuvieron insectos en forma individual.

Los machos en el *lek* experimental tuvieron una longevidad máxima promedio de 36.1 ± 14.6 días. Se compararon los resultados de longevidad con insectos mantenidos en dos condiciones de aislamiento: (A) mantenido en la misma condición de *lek* experimental hasta el 10mo día y luego separado en frascos, (B) todo el tiempo en solitario.

Como era de esperar, el aislamiento incrementó significativamente la longevidad máxima de los machos ($p < 0.05$) (Figura 51). Los machos del *lek* experimental que fueron separados al 10mo día, pero mantenidos individualmente en frascos (A), tuvieron una longevidad máxima promedio de 73.6 ± 50.1 días y fueron significativamente más longevos que aquellos que se mantuvieron juntos en el frasco ($p = 0.007$). Como era de esperar machos mantenidos en solitario (B) tuvieron una longevidad promedio de 76.6 ± 21.5 días,

significativamente más longevos que aquellos en situación de *lek* con 36.1 ± 14.6 días en promedio ($p=0.013$). Inesperadamente las longevidades máxima promedio entre machos de mantenidos en condición (A) y (B) fueron significativamente iguales ($p=0.98$), indicando que los 10 días de *lek* no incidieron.

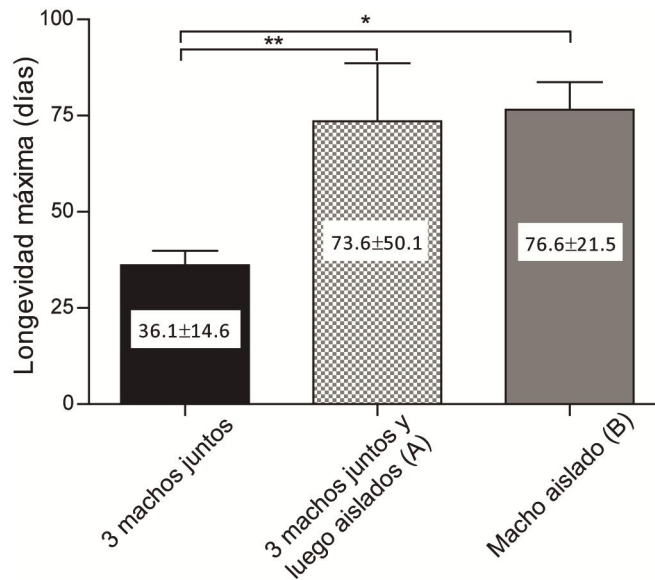


Figura 51. Longevidad máxima promedio de las moscas juntas vs moscas aislados. El asterisco indica que las medias son significativamente diferentes ($p < 0.05$). Los valores señalados dentro de las barras indica Media \pm DE.

6.3.4 Eventos supinos asociados a diferentes perfiles

Se estudió la posibilidad de que el patrón de frecuencia en caídas en posición supina estuviera relacionado con el perfil de cada insecto durante el *lek* según se lo describió anteriormente en el capítulo 2. Asimismo, se correlacionaron patrones de actividad y longevidad con el patrón de caídas.

Las variables que se estudiaron fueron: número de caídas supinas espontáneas, número de caídas supinas inducidas, perfil visitante, perfil defensor, orden de muerte y distancia recorrida en el *lek* durante los 6 días experimentales.

Para esta investigación se empleó un análisis de correspondencia múltiple (sus siglas en inglés, MCA), donde el objeto experimental fue cada macho que formó parte del *lek*. Este análisis permite estudiar asociaciones entre variables categóricas, excluyendo variables continuas. Por lo tanto fue necesario transformar las variables continuas "muerte" y "distancia" en variables categóricas. Para la "muerte" se realizó un ranking por el orden de muerte de cada macho del *lek* ("primero", "segundo" y "tercero" en morir). El mismo razonamiento se empleó para la variable "distancia", donde de los tres machos al de mayor distancia recorrida durante los 6 días de experimentación se lo categorizó como "distancia +++", al segundo en mayor distancia recorrida "distancia ++" y al tercero "distancia+". El resumen de las categorías y subcategoría se puede observar en la Tabla 3 de la página 105.

6.3.4.1 Correlaciones de eventos

El análisis multivariado permitió sintetizar las observaciones dentro del *lek* en un espacio multidimensional de tamaño 12. En la tabla 5 se observa que con las 2 primeras dimensiones se explica más del 30% de la varianza, siendo la primer dimensión la más importante (19.87% de la varianza).

Variable	Categoría	Dimensión 1	Dimensión 2
Orden de muerte	Primero	1.334	3.218
	Segundo	4.009	2.895
	Último	0.409	9.778
Caída espontánea	Caída +++	18.959	0.0085
	Caída ++	9.593	0.660
	Caída +	0.581	0.534
Caída inducida	Caída (I) +++	0.455	0.384
	Caída (I) ++	1.207	8.102
	Caída(I) +	0.172	13.190
Perfil visitante	Visitante +++	16.428	1.974
	Visitante ++	2.059	10.223
	Visitante +	5.784	3.874
Perfil defensivo	Defensivo +++	5.659	6.363
	Defensivo ++	2.721	9.471
	Defensivo +	16.229	0.308
Distancia recorrida	Distancia +++	0.701	16.080
	Distancia ++	4.687	12.743
	Distancia +	9.013	0.194

Tabla 5. Contribución porcentual de cada categoría para las 2 primeras dimensiones del espacio multidimensional.

Variable sintética	Auto valor	Porcentaje de la varianza	Porcentaje de la varianza acumulada
Dimensión 1	0.397	19.868	19.868
Dimensión 2	0.266	13.282	33.150
Dimensión 3	0.243	12.078	45.228
Dimensión 4	0.229	11.459	56.687
Dimensión 5	0.193	9.665	66.352
Dimensión 6	0.166	8.318	74.670
Dimensión 7	0.140	6.991	81.661
Dimensión 8	0.138	6.901	88.562
Dimensión 9	0.093	4.663	93.225
Dimensión 10	0.075	3.762	96.987
Dimensión 11	0.036	1.791	98.778
Dimensión 12	0.024	1.222	100.000

Tabla 6. Se muestran los auto valores del espacio multidimensional del análisis de MCA y el porcentaje de varianza explicada por cada dimensión.

La Figura 52 es la representación gráfica del espacio bidimensional formado por las dimensiones 1 y 2. Se puede observar una alta correlación positiva entre el perfil visitante +++ y el perfil defensor + (Figura 52, línea punteada 1). Por otro lado, el perfil visitante + y el perfil defensor +++ también muestran una asociación positiva entre ellos (opuesta a la del visitante+++/defensor+) (Figura 52, línea punteada 2). El perfil visitante ++ y el perfil defensor ++ también tienen una alta asociación positiva entre ellos (opuesta la de los perfiles visitante+++/defensor+ y visitante+/defensor+++) (Figura 52, línea punteada 3).

La primera dimensión del análisis de correspondencia múltiple explicó el 19.87% de la varianza total (Tabla 6). En la Figura 52, se puede observar que los machos con perfil “visitante +++”, “defensivo +” y con alta frecuencia de caídas supinas espontáneas (caídas +++) correspondieron positivamente. Estas categorías contribuyeron con el 51.6% sobre el total de la dimensión 1 (18.9%; 16.4%; 16.2%, Tabla 5). Este resultado muestra una fuerte asociación entre el alto número de caídas supinas espontáneas y el perfil de interacción del animal dentro del lek experimental, Figura 52.

La segunda dimensión sintetiza el 13.3% de la varianza total restante. Entre las principales categorías fueron la distancia que recorrida por cada mosca en el lek y la caída inducida (Tabla 6). Donde las categorías “distancia +++” y “Caída (I) +” aportaron 16.08% y 13.19% respectivamente. Se pudo determinar que aquellas moscas que caminaron una mayor distancia (distancia +++) tenían un menor número de caídas supinas inducidas “Caída (I) +”.

Del análisis conjunto de las 2 dimensiones se observó que el perfil “visitante +”, se asoció positivamente con el “Defensor ++++” y juntos mostraron una asociación positiva con los últimos machos en morir en el lek.

Análisis de Correspondencia Múltiple

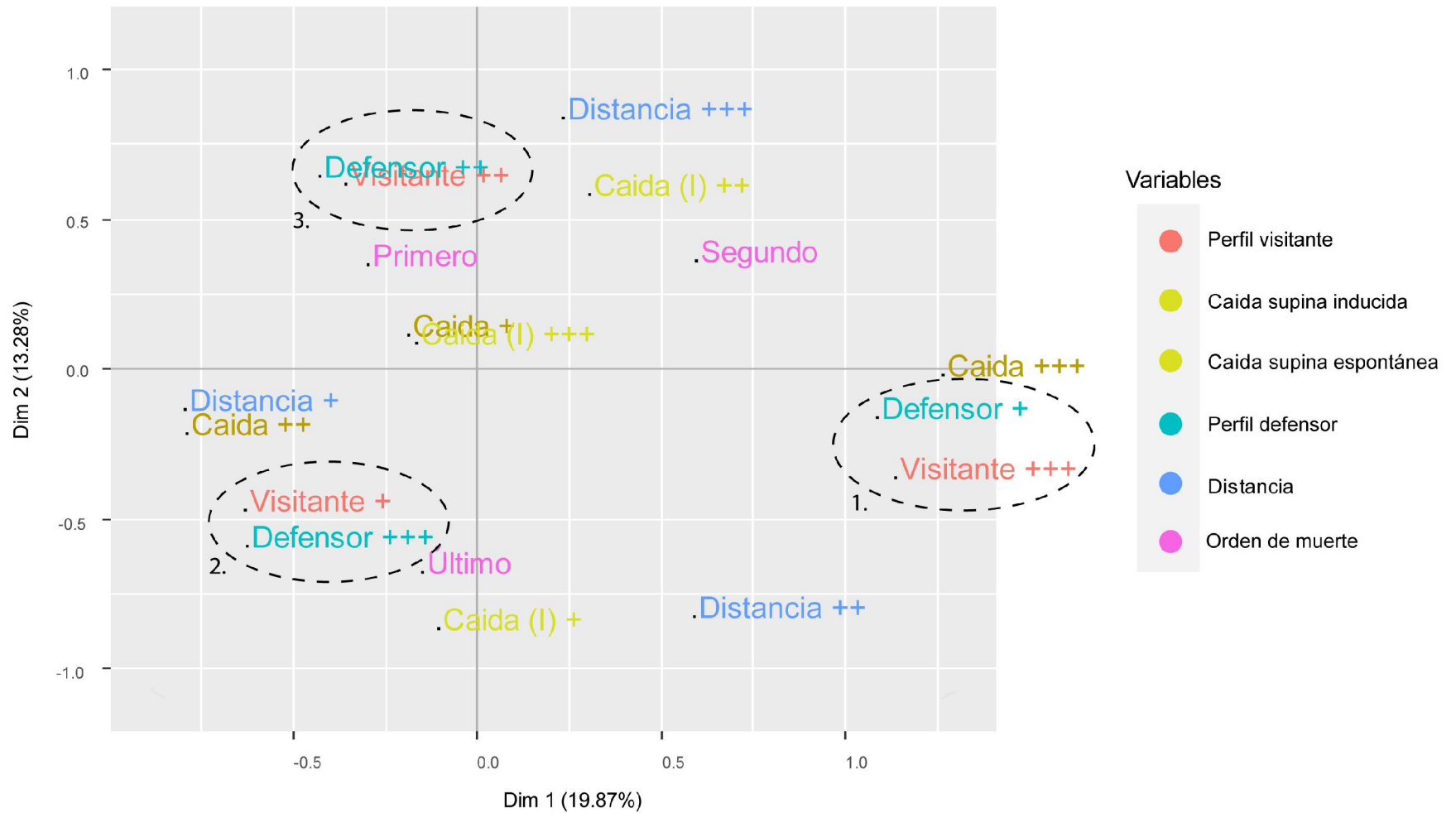


Figura 52. Gráfico de correspondencia múltiple, muestra las asociaciones de las variables: perfil invasor, caída inducida, caída espontánea, perfil defensor, distancia y muerte. Se muestran las dos primeras dimensiones que explican el 33,15% de la varianza total.

6.3.4.2 Confirmación de la asociación de eventos

Para confirmar la significancia del perfil predominante del insecto en el *lek* se recopilaron las mediciones de longevidad, distancia recorrida, número de supinos espontáneos e inducidos, reordenados según el ranking visitante (Figura 53).

La Figura 53-A muestra que los machos “visitante +++” tuvieron en promedio un 43% más de caídas supinas espontáneas que los machos “visitante +” ($p < 0.001$). Sin embargo, en la Figura 53-B se observa que las caídas supinas inducidas no se modificaron entre los machos de distinto ranking visitante ($p > 0.05$). En la Figura 53-C se observa que los machos “visitante +++” tuvieron un 42% más de distancia recorrida ($p < 0.05$), y fueron los primeros en morir ($p < 0.001$) (Figura 53-D). Los machos “visitante +++” murieron en promedio a los 25 ± 12 días mientras que los “visitantes +” murieron en promedio a los 41 ± 27 días (Figura 53-D). Es importante resaltar que el grupo de machos “visitantes +++”, la dispersión del valor de edad de muerte resultó ser homogéneo (Figura 53-G, línea punteada azul). Por otro lado, el grupo de machos “visitantes +” resultó ser homogéneo en el número de eventos de caídas supinas espontáneas e inducidas, como así también en la distancia recorrida en el *lek* (Figura 53-C y D, línea punteada azul).

En la Figura 53 se observa que en general el grupo de machos “visitante ++” resultó muy heterogéneo en todas las variables medidas. En la Figura 53-A, se observa que los machos de “visitante ++” tuvieron un menor número promedio de caídas espontáneas supinas que los animales “visitantes +++” ($p < 0.01$), pero resultaron similares en el número promedio de eventos supinos espontáneos que los machos “visitantes +” ($p > 0.05$). En la Figura 53-C se observa que la distancia recorrida de las moscas “visitante ++” fue muy similar en promedio a la de las moscas “visitantes +++” y más alta que las “visitantes +”, aunque estas diferencias no llegaron a ser significativas ($p > 0.05$).

En cuanto a la edad de muerte, se observó que los machos “visitantes ++” tuvieron una mortalidad promedio similar a la de los machos “visitantes +” ($p > 0.05$); sin embargo, este grupo intermedio tuvo una mortalidad promedio mayor que a la de machos “visitantes +++”, aunque esta diferencia no resultó ser significativamente diferente (Figura 53-D).

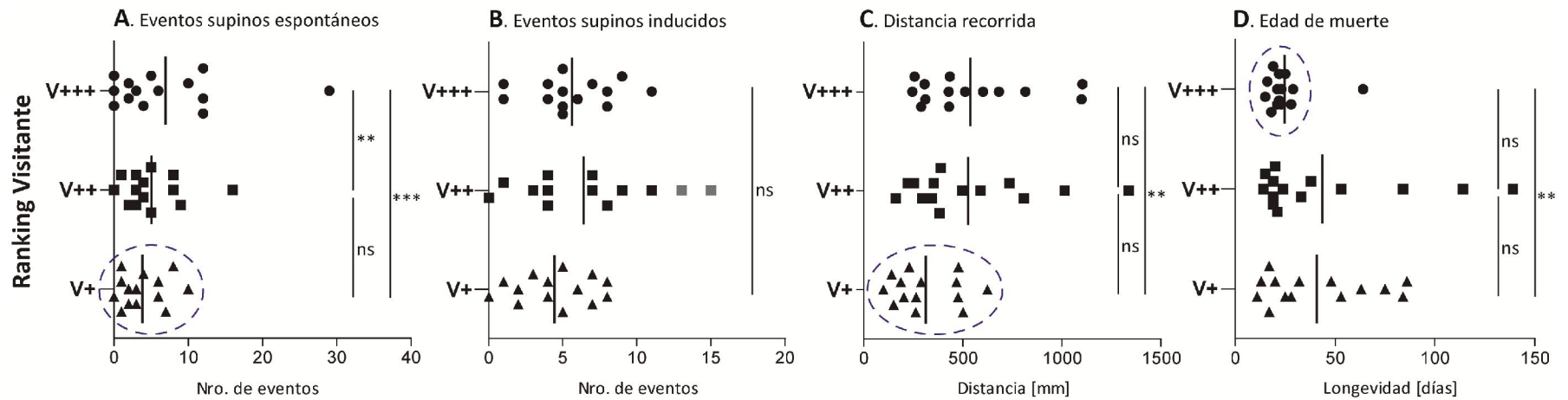


Figura 53 Confirmación del análisis multivariado. Se ordenan las variables estudiadas para el ranking visitante. Código de significancias *** $p < 0.001$; ** $p < 0.01$; * $p < 0.05$; ns $p > 0.05$. La barra horizontal indica el valor promedio. En gris se indican valores de datos que no ajustaron modelado de las distribuciones. El círculo azul resalta los grupos compactos (ver texto).

Existe la posibilidad de que los machos con perfil predominantemente mixto (visitante ++/defensor ++) puedan tener como perfil dos opciones. La Figura 54 muestra el análisis perfiles defensores de los mismos individuos que se mostraron en la Figura 53.

En la Figura 54-A se observa que los machos “defensores +++” tuvieron en promedio un 60% menos de caídas supinas espontáneas ($p < 0.001$) en comparación a los machos “defensivos +” ($p < 0.001$), los machos “defensores ++” tuvieron un 55% menos de caídas supinas espontáneas que los machos “defensores +++” ($p < 0.001$). Más allá de la significancia del p valor de prueba se destaca la respuesta homogénea de los grupos de machos “defensores +++” y “defensores ++” (Figura 54-A, línea punteada azul). En la Figura 54-B se observa que el número de eventos supinos inducidos promedio aumenta cuantos más defensores fueron los machos, sin embargo esta tendencia resultó no significativa ($p > 0.05$).

La Figura 54-C muestra que los machos “defensores +++” recorrieron en promedio alrededor de un 30% menos de distancia que aquellos “defensores +”, mientras que los machos “defensores ++” recorrieron en promedio alrededor de un 20% menos de distancia que aquellos “defensores +”, sin embargo esta tendencia resultó no significativa ($p > 0.05$). Los machos “defensores +++” fueron un grupo de moscas con una distancia recorrida de respuesta homogéneo y compacta, a diferencia de los machos “defensores ++” y los “defensores +” (Figura 54-C, línea punteada azul).

Los machos “defensores +++” murieron en promedio 46.9 ± 37.2 días, los defensores “intermedios ++” murieron en promedio a los 33.3 ± 24.4 días y los “defensores +” murieron en promedio a los 27.1 ± 24.4 días (Figura 54-B). Los machos “defensores +++” vivieron aproximadamente 20 días más que los machos “defensores +”, aunque esta diferencia no alcanzó ser significativa ($p < 0.05$). En la Figura 54-B se observa que los rankings defensores tienen valores muy altos por arriba de la media, esta dispersión aunque fue modelada en el análisis estadístico, afectó la significancia de la prueba. Sin embargo se puede observar que los animales “defensores +” forman en su mayoría un grupo compacto (Figura 54-D, línea punteada azul).

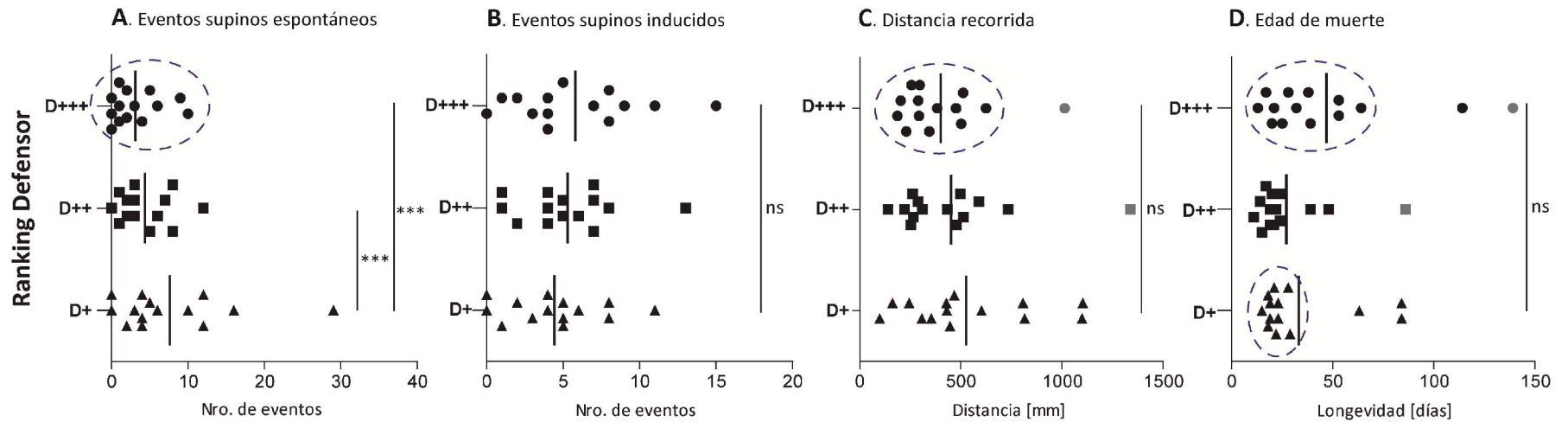


Figura 54 Confirmación del análisis multivariado. Se ordenan las variables estudiadas para el ranking defensor. Código de significancias *** $p < 0.001$; ** $p < 0.01$; * $p < 0.05$; ns $p > 0.05$. La barra horizontal indica el valor promedio. En gris se indican valores de datos que no ajustaron modelado de las distribuciones. El círculo azul resalta los grupos compactos (ver texto).

6.5 Conclusiones y discusión

En este capítulo caracterizamos la peculiaridad del evento supino en las caídas espontáneas de machos de *C. capitata*. (I) Demostramos que la aparición del evento caída, siempre en posición supina, parece estar correlacionada con el perfil comportamental de la mosca en una situación social como es el agrupamiento de *lek*; (II) Demostramos que el evento caída supina espontánea es un predictor temprano de la longevidad.

Hasta donde sabemos es la primera vez que una diferencia comportamental cuantitativa tan temprana como ésta permite predecir el tiempo de muerte con tan alta probabilidad y con tanta anticipación; ya que se trata de individuos muy jóvenes. Como ya se discutió en el capítulo anterior, el *lek* experimental está muy lejos de ser un *lek* natural debido principalmente a que los machos día a día fueron los mismos y cohabitaron en un espacio limitado que no les permitió separarse en gran distancia, sin embargo fue suficiente como para identificar perfiles comportamentales de alta correlación con el estado de senescencia funcional.

Observaciones sobre recuperación del individuo con caídas espontáneas supino.

En el análisis de supinos totales determinamos que durante el *lek* experimental hubo tres intervalos de tiempo de recupero del supino que fueron mayoritarios: rango 0-0.99 segundos (40.1%), rango 1-1.99 segundos (12,7%) y rango 2-2.99 segundos (25.1%) (Figura 48-A). Este resultado demostró que la mayoría de los machos (40.1%) se recuperaron casi inmediatamente de la caída supina (0-0.99 segundos), mientras que en segundo lugar el otro grupo grande de machos (25.1%) se recuperó entre los 2 y 2.99 segundos. Sorpresivamente, el rango 1-1.99 segundos (correspondiente al intervalo de tiempo intermedio entre los picos de frecuencia) fue el menor de los tres (12,7%) (Figura 48-A). Este perfil de frecuencias de tiempo de recupero observadas se repitió tanto para eventos supinos espontáneos como inducidos, lo cual indicaría que mayoritariamente e

independientemente del origen de la caída supina el macho al caer sobre su dorso (supino) se recuperaría inmediatamente (rango 0-0.99) o se demoraría 2 o más segundos en darse vuelta (rango 2-2.99 segundos en adelante) (Figura 48-B).

Nuestras observaciones a partir del análisis de las video filmaciones en cámara lenta indicaron que los machos que se recuperaron inmediatamente emplearon un rápido movimiento de alas para recuperar la posición prono, mientras que los machos con un tiempo de recupero de la posición supina mayor a dos segundos emplearon patas y alas para volver a la posición prono. Takahashi et al. (2017) demostró que la fuerza de impacto en la caída de una moscas con sus patas contra el suelo es menor que si golpeará con alguna otra parte de su cuerpo, es entonces que al evento supino además del impacto mosca-suelo otro factor importante sería el desgaste físico por el recupero de la posición supino a prono.

En oposición a lo informado por Papadopoulos et al. (2002) determinamos que el número de eventos supinos espontáneos totales en frascos de machos aislados es muy bajo en comparación a los registrados en nuestro *lek* experimental. Por lo tanto la caída espontánea supina es un evento "normal", que se intensifica en el número de eventos cuando se da una situación de cohabitación de machos de *C. capitata*. Gaskin et al. (2002) describió el efectos del aumento de densidad machos en frascos poblacionales de machos vírgenes. Los investigadores determinaron que a mayor densidad mayor frecuencia de aleteo, deambule en el frasco y actividad de llamado a la hembra, sin embargo no analizaron el *lek* y el perfil preponderante de cada macho durante el *lek*.

Determinamos que durante el *lek* experimental el número de eventos caídas supinas espontáneas correlacionó con el perfil comportamental, la motricidad y por sobre todo con la longevidad. Esto adquiere mucha importancia porque entonces los eventos pasan a ser predictores confiables de longevidad. Como ya se discutió en el capítulo 5, determinamos que durante el *lek* los machos podían comportarse como defensores o visitantes. Los machos más defensores fueron aquellos que tuvieron un menor número de caídas supinas espontáneas, recorrieron una menor distancia dentro del *lek* y fueron los

más longevos; mientras que los menos defensores tuvieron un mayor número de caídas supinas espontáneas, mayor distancia recorrida y vivieron menos. Demostramos que lo opuesto resultó para el análisis del perfil visitante de los machos, donde los machos más visitantes fueron los que tuvieron mayor número de caídas espontáneas supinas, mayor distancia recorrida y fueron los que vivieron menos.

El trabajo de Pujol-Lereis (2012) realizado en nuestro laboratorio marcó un antecedente en los estudios de senescencia de insectos, ya que demostró que el perfil lipídico reflejaría el estado de senescencia funcional de los individuos que componen a la población de *C.capitata*. En sus estudios separó a la población de machos vírgenes según la respuesta a estrés térmico; con el objetivo de comprender las diferencias entre los individuos que componen la población de laboratorio de *C.capitata* y su influencia en la trayectoria de mortalidad. Demostró que dentro de la población de machos de 15 días hubo una subpoblación que tuvo una respuesta más lenta al recupero del estrés, determinó que esta tenía un patrón lipídico similar al de moscas viejas y observó que esta subpoblación vivió menos que aquella subpoblación que tuvo una respuesta más rápida de recupero al estrés. Sin embargo no observó diferencias significativas empleando cohortes de machos muy jóvenes (menores de 15 días), como los estudiados en esta tesis. Es entonces que el evento de caída espontánea en posición supina pone en evidencia un estado funcional diferencial entre los individuos de la población de *C.capitata*, tan sutil que resultó indetectable para estos estudios bioquímicos/comportamentales.

Por tanto, nuestro predictor se destaca por sobre otros métodos destructivos, que eventualmente pueden ser predictivos poblacionales para el resto de los individuos, ya que es necesario realizar ensayos bioquímicos, laboriosos y de largo tiempo (Camin et al., 1992; Hugo et al., 2013; Pujol-Lereis et al., 2016; Pujol-Lereis et al., 2012) o bien de aquellos que se analizan en situaciones comportamentales muy alejadas de lo natural (Gargano et al., 2005; Jones & Grotewiel, 2011; Tower et al., 2019).

Capítulo 7

Expresión génica asociada al comportamiento supino

7.1 Introducción

Son pocos los dípteros que establecen *leks*, fundamentalmente son cicloráfidos tefrítidos, para los cuales no están muy desarrollados los estudios de expresión genética y desde luego mucho menos que los estudios en *Drosophila*. Como se mencionó en los otros capítulos, los machos de *D. melanogaster* se agrupan sobre el alimento e interaccionan, lo que obviamente genera un comportamiento del grupo como un todo (Philippe et al., 2016). La composición del grupo puede modificar los fenotipos comportamentales individuales. Las diferencias individuales en perfiles comportamentales se pueden asociar a diferencias en el genotipo (Sachser et al., 2013; Saltz, 2011; 2013) y en el perfil epigenético heredado, principalmente como metilaciones (Heyn, 2014; Turner, 2007). La epigenética es la respuesta de corto plazo a los cambios del ambiente o entorno, mientras que cambios genéticos en la línea germinal proveen cambios o adaptaciones a largo plazo (Miller, 2010; Mulligan, 2018). Por lo tanto, los perfiles comportamentales pueden verse muy influenciados por el entorno en el que vive el individuo (Gross & Hen, 2004; Gullan & Cranston, 2014), que genera nuevos cambios epigenéticos y eventualmente comportamentales, que se suman a los heredados (Berger et al., 2009). Muchos de los cambios epigenéticos ocurren en respuesta a los estímulos del entorno que el individuo ha vivido a edades tempranas como larva. Las interacciones grupales tanto en dípteros adultos como inmaduros, modifican la esperanza de vida, especialmente en casos de exceso interacciones (Gaskin et al., 2002; Graves & Mueller, 1993; Joshi & Mueller, 1997; Lushchak et al., 2019). La densidad de larvas en cultivos de *Drosophila melanogaster* correlaciona, por ejemplo, con el tamaño y longevidad del adulto (Baldal et al., 2005; Stefana et al., 2017). A mayor número de larvas, y por tanto de contactos, la esperanza de vida tiende a disminuir (Joshi & Mueller, 1997; Sørensen & Loeschcke, 2001).

Los patrones especializados de movimientos tales como la locomoción, masticación, deglución, respiración y otros son característicos de diferentes regiones a lo largo del eje del cuerpo donde se disparan secuencias de expresión génica altamente

específicas. Los circuitos motores subyacentes a estos movimientos se distribuyen a lo largo del eje del sistema nervioso central y pueden ser activados de acuerdo con las necesidades comportamentales (Grillner, 2006). Es en los artrópodos, tales como *Drosophila*, donde es más evidente esta diversificación del sistema nervioso a lo largo del eje del cuerpo. La diversidad de segmentos corporales y estructuras tales como patas, alas y piezas bucales se corresponden con redes neuronales especializadas a nivel local, inicialmente a nivel de cada compartimiento parasegmental y consecuentemente de cada segmento; que impulsan así los diferentes movimientos característicos de cada tipo de apéndice (Wigglesworth, 1977).

Como es ampliamente conocido, *Drosophila melanogaster* es un modelo experimental animal que cuenta con una gran variedad de herramientas genéticas. Esto ha permitido estudiar en este insecto varios genes que en humanos están asociados a anomalías en la motilidad corporal. En particular se han estudiado ataxias y neurodegeneración mediante el empleo de cepas mutantes y transgénicas de *Drosophila*, que permitieron la manipulación de la expresión y la prueba de su efecto funcional en el insecto (McGurk et al., 2015; Preat & Goguel, 2016; Ugur et al., 2016).

Los patrones atáxicos de *Drosophila* y otros insectos han resultado compartir genes ortólogos de los asociados con ataxias en mamíferos en general y humanos en particular (Monnier et al., 2018). Se sabe que la desorganización del movimiento está relacionada con neurodegeneración y el envejecimiento prematuro en humanos (Shiloh & Lederman, 2017; Stagni et al., 2018). Se han empleado otros modelos animales, en particular a *Drosophila*, para estudiar el deterioro locomotor relacionado con la edad (Jones & Grotewiel, 2011). En la tabla 7 se muestra una lista de genes asociados a ataxias o enfermedades vinculadas con descoordinaciones motoras en humanos que han sido estudiados en *Drosophila*, donde se detallan los principales desordenes comportamentales.

Mutación	Enfermedades humanas	longevidad	Behavioural assay	Obs.	Ref.
Parkin	Parkinson (PD)	reducida	Geotaxis reducida	Movilidad reducida	Ren et al. (2003)
α -synuclein	Asociada a PD	reducida	Geotaxis reducida	Movilidad reducida	Chen et al. (2014b)
High Temp. Requirement A2 (HtrA2/Omi)	Asociada a PD	reducida	Geotaxis reducida	ND	Tain et al. (2009)
Leucine-rich repeat kinase	Asociada a PD	reducida	Geotaxis reducida	ND	Liu et al. (2008b)
Sirtuin1	PD y Alzheimer	ND	ND	ND	Herskovits and Guarente (2014)
ATM	Ataxia telangiectasia	reducida	Geotaxis reducida	Movilidad reducida	Petersen et al. (2012)
Presenilin	Alzheimer	reducida	Geotaxis reducida	ND	Boyles et al. (2010)
Ab42	Alzheimer	reducida	Geotaxis reducida	ND	Rogers et al. (2012)
Ataxin-7	Ataxia Spinocerebellar 7	reducida	Geotaxis reducida	Movilidad reducida	(Ajayi et al., 2012; Mohan et al., 2014)
Methionyl-tRNA Synthetase	Ataxia espástica tipo 3 (SPAX3)	reducida	ND	No vuela	Bayat et al. (2012)
Dystrophin Glycoprotein Complex (DGC)	Perdida habilidades cognitivas.	reducida	ND	ND	Marrone et al. (2011); Taghli-Lamalle et al., 2008)
Dspastin (SPG4)	Hereditary spastic paraplegias (HSPs)	reducida	Geotaxis reducida	Movilidad reducida	Orso et al. (2005)
Fratxin	Ataxia de Friedrich (FA)	reducida	Geotaxis reducida	ND	Navarro et al. (2010)
Factor Relish	Ataxia-telangiectasia	reducida	Geotaxis reducida	ND	Petersen et al. (2013)
Transthyretin (TTR)	Familial amyloidotic polyneuropathy	reducida	Geotaxis reducida	Movilidad reducida	Pokrzywa et al. (2007)
Tyrosine Hydroxylase	Dopamine metabolism affected	normal	Geotaxis reducida	Movilidad reducida	Riemensperger et al. (2011)

Tabla 7. Genes estudiados en *Drosophila melanogaster* asociados a ataxias humanas. ND: no hay datos documentados.

La supinez como fenocopia de ataxias

En el capítulo 6 hemos caracterizado cuali y cuantitativamente las caídas supinas y demostrado su aparente importancia como predictoras. Por lo expuesto en capítulos anteriores, la "supinez" revelaría un sutil estado funcional diferente, ya que hemos demostrado su correlación con la longevidad, el perfil en el *lek* y la actividad. Postulamos al evento "supinación" como probable biomarcador del estado general (homeostasis funcional) de los machos jóvenes de *C. capitata*, en cuya observación subyace la variabilidad genómica y epigenómica propia de cada individuo que compone la población; estudiada en el laboratorio mediante *leks* experimentales. En este capítulo se detalla estudios de correlación de un patrón de comportamiento especial y bastante sutil como es el de caídas supinas, que involucra un circuito locomotor complejo para patas y alas, con patrones de expresión diferenciales.

Estudios transcriptómicos

El transcriptoma es el conjunto completo de transcritos en una célula, un tejido o un organismo, y su nivel para una etapa específica de desarrollo o condición fisiológica. El transcriptoma refleja el estado de homeostasis funcional y de senescencia fisiológica funcional. Analizar el transcriptoma es esencial para conocer e interpretar los elementos funcionales del genoma para cada situación fisiológica y así revelar los constituyentes moleculares de células y tejidos (Wang et al., 2009).

Actualmente, y gracias a los grandes avances en las técnicas de secuenciación del ADN, a través de tecnologías de nueva generación, NGS (del inglés *Next Generation Sequencing*), se han revolucionado campos como los de la genómica y la transcriptómica. La caracterización completa y el análisis global de la expresión génica aún sin ninguna información genómica previa, es ahora posible a través de la implementación la secuenciación directa de ARN, tecnología conocida como RNA-seq (Garber et al., 2011). En el corto tiempo que esta tecnología se encuentra disponible se han desarrollado un grupo amplio de investigaciones dirigidas a caracterizar y a cuantificar transcriptomas. La técnica de RNA-seq se ha llevado a cabo en numerosas especies eucariotas especialmente en

aquellas en las que el genoma ha sido estudiado desde hace tiempo como *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Drosophila melanogaster*, ratón y humano (Gan et al., 2010; Maher et al., 2009; Mortazavi et al., 2008; Nagalakshmi et al., 2008; Peng et al., 2012; Pickrell et al., 2010). En *C. capitata* existen escasos trabajos que empleen esta técnica. Casi todos ellos están enfocados en el análisis de expresión génica en el marco de la mejora de la técnica del insecto estéril; ya sea para mejorar la producción en masa (Gomulski et al., 2008; Nash et al., 2018; Salvemini et al., 2014), como en estudios de distribución y aclimatación de esta mosca en zonas afectadas (Calla et al., 2014; Papanicolaou et al., 2016).

El trabajo de Papanicolaou et al. (2016) fue clave para nuestros estudios transcriptómicos de *Ceratitis capitata*, ya que permitió tener acceso a una base de datos actualizada con más de 1800 de secuencias transcritos correctamente ensamblados, base de datos que hasta ese entonces era escasa en cantidad y calidad de secuencias (Gomulski et al., 2008).

En nuestros estudios, decidimos emplear principalmente la técnica de RNA-seq con el objetivo de identificar genes cuya expresión se encuentre aumentada o reducida en las moscas con alto número de caídas supinas. Permitiendo así correlacionar genes específicos (o grupos de genes) con funciones y vías metabólicas (a partir del estudio de la ontología genética) que puedan estar asociadas a este comportamiento.

7.2 Objetivo general

Asumiendo como hipótesis el valor predictivo del “comportamiento supino” diferencial de moscas mediterráneas muy jóvenes y fisiológicamente normales nos propusimos correlacionar patrones diferenciales con su expresión génica.

Objetivos específicos:

- Realizar una secuenciación completa de 2 situaciones transcripcionales, con el objetivo de caracterizar los perfiles diferenciales de expresión génica para insectos con alto y muy bajo número de caídas espontáneas en posición supinas.
- Analizar las diferencias de expresión más notorias para eventualmente relacionarlas con el comportamiento supino. focalizando el interés en genes conocidos asociados a ataxias y longevidad.
- Una vez detectados genes de interés, nos planteamos confirmar los resultados mediante la técnica de PCR en tiempo real e iniciar estudios de algunos de los genes relevantes seleccionados, incluyendo el bloqueo de la expresión mediante la técnica de RNA de interferencia.

7.3 Materiales y métodos

7.3.1 Expresión diferencial de genes

Extracción de ARN

Se utilizó el kit comercial TRI Reagent, y se siguió el protocolo recomendado por los fabricantes (Sigma-Aldrich). Cada muestra de cabeza y tórax se homogenizó en 0,5 mL de TRI Reagent, se centrifugó (12000 g, 20 min) y se pasó el SN a otro tubo. Se dejó a temperatura ambiente (TA) 10 minutos, se agregaron 100 µL de cloroformo al SN, se agitó vigorosamente, se dejó 15 minutos a TA, se centrifugó (12000 g, 15 min), y se pasó la fase superior (FS) a otro tubo. Se le agregaron 0,25 mL de isopropanol a la FS, se mezcló, se dejó 15 minutos a TA, se centrifugó (12000 g, 15 min), y se descartó el SN. Se lavó el pellet tres veces agregando 1 mL de etanol 75%, centrifugando (7500 rpm, 5 min) y descartando el SN. Se dejó secar el pellet a TA y se resuspendió en 20 µL de agua tratada con DEPC (dietilpirocarbonato) 0,1% (1 minuto a 50°C). Se guardó a -80°C hasta su uso.

Preparación ADNc

Se cuantificó el ARN utilizando un espectrofotómetro NanoDrop 2000 (Thermo Scientific), y se controló que la relación de absorbancias de 260/280 nm fuera $\geq 1,7$, para descartar niveles significativos de contaminación con proteínas. Se sintetizó ADNc a partir de 500 ng de ARN utilizando la enzima M-MLV RT (Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase), siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante (Promega). Brevemente, para cada muestra se mezclaron 500 ng de ARN y 250 ng del cebador adaptador Oligo-dT (Promega) en un volumen final de 15 µL de agua. Se incubó 5 minutos a 70°C, y luego se colocó inmediatamente en hielo para prevenir la formación de estructuras secundarias. Se agregaron 5 µL de M-MLV 5x *Reaction Buffer* (Promega), 1,25 µL de una mezcla de dNTPs (10 mM cada uno), 25 unidades del inhibidor de proteasas RNasin (Promega), 200 unidades de M-MLV RT, y agua hasta completar un volumen de 25 µL. Se agitó suavemente y se incubó 60 minutos a 42°C. Luego se guardó a -20°C hasta su

utilización. Para las incubaciones se usó una termocicladora PCR Express, ThermoHybaid (Thermo Life Sciences).

Electroforesis en gel de agarosa

Los productos de PCR fueron separados por electroforesis. Se le agregó solución tampón de carga 6x (glicerol 30%, bromocresol azul 0,25%) a las muestras a una concentración final de 1x. El gel de electroforesis se preparó con agarosa 1% en solución tampón TAE 1x (Tris-acetato-EDTA) y 1 μ L de bromuro de etidio (10 mg/mL) cada 20 mL de gel. Se utilizó como solución tampón de corrida TAE 1x, y la fuente de poder se colocó a 40-50 V y 300 mA. Se visualizó el resultado bajo luz UV.

Secuenciación completa del transcriptoma

El ARN total fue extraído de cabezas de moscas macho. Se compararon muestras de cabezas de dos grupos de moscas; grupo A: con más de 4 caídas, grupo B: con 0, 1 o 2 caídas espontáneas, respectivamente. Se emplearon 3 réplicas biológicas por grupo, donde cada réplica contenía 5 cabezas.

Para la extracción de ARN se empleó la técnica de TRI-*Reagent* como se describió en la sección 3.6.1. El ADN genómico fue removido tratando a la solución de ARN con DNAsa I. Para la determinación de la concentración y calidad de ARN se utilizó el *Qubit fluorometer* (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA, USA) y Agilent 2100 Bioanalyzer (Santa Clara, CA, USA). En *Ceratitis capitata*, como en otros insectos, la subunidad 28S del ARNr consiste en dos fragmentos separados que se unen por puentes de hidrógeno. Dependiendo el pretratamiento de las muestras de ARN, la interrupción de esa unión puede producir la aparición de dos fragmentos de similar tamaño que el 18S rARN, esto puede llevar a la aparición de lecturas incorrectas en el *RIN score* del *Agilent 2100 Bioanalyzer* (Winnebeck et al., 2010). Confirmamos la integridad del ARN total mediante la presencia de las bandas de 18S y 6S realizando electroforesis en 1% gel TAE sembrando 400ng de ARN.

Todo el servicio de secuenciación fue provisto por Novogene Sequencing Center (California, USA). Cada muestra de RNA total fue preparada para secuenciar utilizando el método TruSeq RNA (Illumina Inc., San Diego, CA, USA). Se construyeron 6 bibliotecas, los insertos de ADNc fueron entre 250 y 300 pares de bases y fueron secuenciadas desde un solo extremo (*single end*) mediante la tecnología *Illumina Hiseq PE150*.

Procesamiento de las lecturas de RNAseq

Las lecturas obtenidas fueron mapeadas en el genoma de *Ceratitidis capitata* Ccap_2.1 (Código de Ensamblado: GCF_000347755.2) (Papanicolaou et al., 2016) usando TopHat v2.1.1155 (Trapnell et al., 2009) con los parámetros preestablecidos, a excepción de largo máximo de intrón que fue establecido en 5000pb. Finalmente, a partir de los archivos de alineación (archivos bam) generados y empleando *scripts* de R creados en el laboratorio se obtuvieron las tablas de cuentas (*counts*) que permiten analizar la expresión diferencial.

Análisis de Expresión diferencial

Antes de proceder con el análisis se descartaron aquellos genes que poseían menos de 10 lecturas en promedio por condición. La expresión diferencial se determinó empleando el paquete edgeR versión 3.4.2156 (Robinson et al., 2010). En el mismo se propone en primer lugar, aplicar un factor de normalización para corregir posibles desbalances entre la profundidad de secuenciación de cada muestra y también la composición de ARN de cada muestra. En este tipo de experimentos, los datos se ajustan a un modelo binomial negativo, donde se estima el coeficiente de variación biológica (BCV), que comprende la variabilidad debido a la técnica en sí misma y a la variabilidad biológica (Mancini, 2016).

Dado que las poblaciones experimentales de laboratorio de *C. capitata* poseen una variación genética intrínseca (microheterogeneidad) (Nash et al., 2018), se empleó como criterio estadístico el valor P calculado con un modelo binomial negativo, correspondiente a la estimación de diferencias entre medias sin corrección. Genes con valores de P

menores o iguales a 0,05 y con un $\text{Log}_2 \text{Fold Change}$ (LogFC) absoluto mayor a 0,4 fueron considerados como diferencialmente expresados.

7.3.2 Amplificación de mensajeros específicos

Se amplificaron los ADNc específicos mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando la enzima GoTaq (Promega). En tubos eppendorf de 0,2 mL se colocaron 10 μL de GoTaq *Reaction Buffer* (Promega), 1 μL de dNTPs (10 mM cada uno), 1 μL de cebador directo (para cada secuencia), 1 μL de cebador inverso (para cada secuencia), 0,25 μL de GoTaq DNA Polymerase (5 unidades/ μL), 1 μL de ADNc y agua hasta 50 μL . Se utilizó una termocicladora PCR Express, ThermoHybaid (Thermo Life Sciences). El programa constó de tres etapas: i) desnaturalización inicial, 2 minutos a 95°C; ii) 25 ciclos como sigue: a- desnaturalización, 30 segundos a 95°C; b- cebado o *annealing*, 2 minutos a 55°C; c- polimerización, 1 minuto a 72°C; iii) polimerización final, 5 minutos a 72°C.

Se utilizaron cebadores específicos de *C. capitata* para los genes *turtle*, *ATM*, *parkin*, SOD1, SOD2, catalasa (Tabla 8). Como estándar interno de amplificación se utilizó el gen que codifica para la proteína ribosomal P0 (CcP0).

Gen	Cebador	Secuencia
<i>turtle</i>	directo	AATCGTGATCCCAAGCAGCA
	reverso	GGTGTACCATCGGCTTGACA
<i>ATM</i>	directo	CTGGTTTGCGATTCTTGCCG
	reverso	TGGCCGATATGTTGAGCACC
<i>parkin</i>	directo	CATTACCTTGTCAGCGGGT
	reverso	CCACCTGCCTGCAAGACATA
<i>SOD1</i>	directo	ACACGAATTCGGGGACAACA
	reverso	CGGTTCAAATCGGATGGTGC
<i>SOD2</i>	directo	TACCAACGCCGCAAAAACGG
	reverso	TTCACGGCAGATGATCGGTT
<i>catalasa</i>	directo	AAATGGCCAATCGCGACG
	reverso	GGATTGCCAGATCCTGTGGT
<i>CcP0</i>	directo	TGTTTCATTGTTGGCGCTGA
	reverso	GCGAATAGCTTTGCGCATCA

Tabla 8. Cebadores utilizados para la amplificación de mensajeros específicos.

7.3.3 Secuenciación de genes

Se empleó el método de secuenciación directa, que consiste en el aislamiento del producto de PCR por electroforesis en gel de agarosa. La banda junto con los cebadores específicos empleados para la amplificación fueron enviados al servicio de secuenciación que brinda la Fundación Instituto Leloir.

7.3.4 Construcción de ARN de interferencia

Aspectos generales

Se empleó el kit comercial MEGAscript® ARNi para preparar ARN doble cadena a partir de la secuencia de genes específicos. Para la síntesis se preparó un molde de ADN con los promotores T7 opuestos al final de cada extremo 5'. Mediante esta configuración, la ARN T7 polimerasa permitió sintetizar dos ARN simple cadena complementarios que dieron lugar al ARN doble cadena en un mismo tubo. Los pasos para obtener el ARN doble cadena fueron: amplificación, transcripción, digestión y purificación.

Amplificación

Se realizó una PCR empleando dos pares de cebadores con la región promotora del T7 en extremo 5' libre (tabla 3). En el primer ciclo de amplificación de PCR se utilizó una temperatura de fusión (Tm) 5 grados mayor a la calculada, ya que en esa ronda sólo

hibridó la porción del cebador específica de la secuencia molde, de esta forma se evitó la aparición de productos no específicos. Luego de 5 ciclos la temperatura que se utilizó fue la calculada para el cebador con la secuencia del T7 (Tabla 9).

La reacción de amplificación del ADN molde fue igual que la reacción de PCR descrita anteriormente. El programa de amplificación fue: i) desnaturalización inicial, 2 minutos a 95°C; ii) 25 ciclos como sigue: a- desnaturalización, 30 segundos a 95°C; b- cebado o *annealing*, 2 minutos a 55°C; c- polimerización, 1 minuto a 72°C; iii) polimerización final, 5 minutos a 72°C.

Gen	Cebador	Secuencia
<i>turtle+T7</i>	directo	TAATACGACTCACTATAGGGAGACACAGGACTCACCGTTCCGGTTC
	reverso	TAATACGACTCACTATAGGGAGACGCCGCCGCTATTATAACAC
<i>turtle</i>	directo	CACAGGACTCACCGTTCCGGTTC
	reverso	CGCCGCCGCTATTATAACAC

Tabla 9. Cebadores utilizados para la amplificación y construcción de RNAi.

Transcripción

A partir de 1-2ug de ADN molde con el inserto del promotor T7 se agregó: 2ul de solución de reacción T7 (10x), 2ul de ATP, 2ul de CTP, 2ul de GTP, 2ul de UTP, 2ul de enzima T7 y se llevó a volumen final de reacción de 20ul con agua milli-q estéril. Se mezcló suavemente y se dejó incubar a 37°C durante 4 horas utilizando un bloque caliente.

Digestión

A los 20ul finales de reacción del paso anterior se agregó: 21ul de agua milli-q, 5ul de solución tampón de digestión, 2ul de DNAsa I, 2ul RNAsa. Se incubó la reacción a 37°C durante 1 hora.

Purificación

El objetivo de este paso fue la eliminación de proteínas, nucleótidos libres y productos de degradación del paso anterior. Para ello se tomó 50ul de la solución final de la digestión y se agregó 50ul de solución tampón de unión (10x), 150ul de agua milli-q y 250ul de etanol 100%. Luego de mezclar suavemente se procedió a filtrar. Para ello se emplearon las columnas de filtración provistas por el kit y un tubo colector. Se centrifugó

a máxima velocidad por 2 minutos, quedando en ARN retenido en la membrana del filtro y se descartó el líquido colectado.

Para recuperar el ARN doble cadena del filtro se vertió sobre el filtro 50-100 ul de solución de elución previamente calentada a 95°C y posteriormente se centrifugó a máxima velocidad por 2 minutos. El líquido colectado conteniendo el ARN doble cadena purificado tuvo una concentración de 204ng/ul y fue guardado a -20°C hasta su utilización.

Suministro del ARN de interferencia

Las moscas utilizadas partieron de huevos sincronizados, colocados en alimento de larva y mantenidos bajo las mismas condiciones de cría generales (Rabossi et al., 1991). A las 56hs cuando comenzó la eclosión se colectaron 30 larvas de estadio 1 y se los colocó en un recipiente conteniendo 200ul de alimento de larva más 1ug del ARN de interferencia. Luego de transcurridas 6 días cuando las larvas finalizaban el estadio 3, se las pasó a un recipiente de 30ml de volumen con alimento de larvas solo y se las mantuvo ahí hasta el momento de salto y pupariación. Transcurridas 72 hs desde la pupariación los individuos fueron separados de la arena y fueron colocados en un frasco con alimento y bebida hasta el momento de la emergencia según materiales y métodos página 16.

7.3.5 Medición de la respuesta geotáctica (RING).

El armado del equipo utilizado y el método "RING" ensayado fue adaptado por Pujol-Lereis y colaboradores (2012) para *Ceratitis capitata* a partir del propuesto por Gargano y colaboradores (2005) para *Drosophila melanogaster*.

Se separaron moscas macho vírgenes de *Ceratitis capitata*, se colocaron lotes de 8 moscas por frasco de 500 ml y se mantuvieron en condiciones estándar (Mantenimiento de la población de laboratorio, página 24). Al 5to día de edad se midió el comportamiento de geotaxis negativa, como se explica a continuación. El día anterior al experimento se durmieron las moscas bajo flujo de CO₂ y se colocaron 8 moscas en una probeta de 250 ml., alimentadas con una solución azucarada de agar 1%. A las 14hs del día siguiente se

realizó el experimento. Las probetas con moscas se colocaron en el dispositivo experimental (Figura 55). El dispositivo se golpeó verticalmente 3 veces de manera tal que las moscas queden en el fondo de la probeta. Luego de 10 segundos, se tomó una fotografía con una cámara digital. El procedimiento se repitió 8 veces, con intervalos de dos minutos. Se analizaron las fotografías con el programa *Scion Image* (software de uso gratuito, provisto por Scion Corporation), que permite medir la altura exacta en la cual se encuentran las moscas dentro del dispositivo experimental. Se calculó la altura promedio de las moscas en la probeta para cada repetición, y se promediaron los valores de las repeticiones 3 a 7.

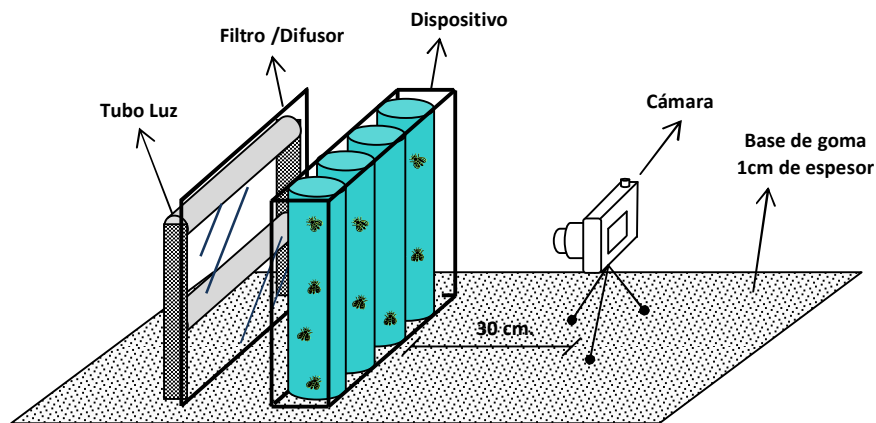


Figura 55. Esquema del equipo y disposición utilizados para el ensayo de Geotaxis negativa.

7.4 Resultados

7.4.1 Parte A: Análisis de expresión génica

Para la obtención de muestras de moscas supinas, se empleó el mismo esquema experimental que se utilizó en los capítulos 2 y 3 con la diferencia de que al 10mo día, luego de terminado el registro de actividades, se separaron y congelaron individualmente los machos de cada *lek*. En el análisis de las video grabaciones, se identificaron los individuos, se contabilizó el número de caídas y se dividieron en dos grupos: **A.** machos con 4 o más caídas espontáneas supinas y **B.** machos con 2 o menos caídas espontáneas supinas. De cada grupo se separaron las cabezas del resto del cuerpo y se procedió a la extracción del ARNm según se describe en materiales y métodos (Figura 56). Idealmente hubiera sido contar con suficiente número de individuos sin ninguna caída supina, pero eso no fue posible dada la extensión temporal de cada serie de experimentos y la baja abundancia de moscas con cero caídas espontáneas supinas.

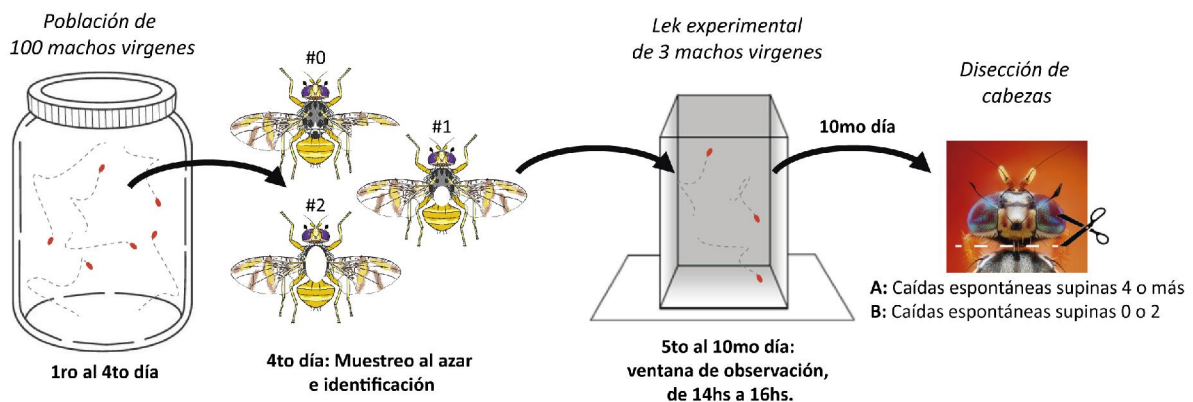


Figura 56. Esquema experimental utilizado para la separación de las cabezas de los machos del lek experimental.

Se analizó el transcriptoma expresado en cabezas del grupo A y B a partir de la técnica de secuenciación completa del transcriptoma o RNAseq utilizando la tecnología Illumina Hiseq PE150, provisto por *Novogene Sequencing Center* (California, USA). Se analizaron 3 réplicas de cada grupo, con 5 cabezas cada una. Se midió un promedio de 25

millones de lecturas por réplica, con una tasa de efectividad total del 96% (Tabla 10). Como se puede ver en la tabla 8 cada réplica tuvo una alta tasa de lecturas y fueron muy similares entre ellas.

Muestra	Rep	Lecturas crudas	Lecturas limpio	Tasa de efectividad [%]
Grupo A	1	26931504	25885841	96.12
Grupo A	2	21715208	20936487	96.41
Grupo A	3	23248688	22190385	95.45
Grupo B	1	25250602	24329850	96.35
Grupo B	2	24967167	23779727	95.24
Grupo B	3	25470017	24657129	96.81
Total		147583186	141779419	96.07

Tabla 10. Número de lecturas por muestra obtenidas del Illumina Hiseq PE150. Grupo A= 4 o más caídas y Grupo B= 0; 1 o 2 caídas.

Las lecturas obtenidas fueron referidas y mapeadas con respecto al genoma de *Ceratitidis capitata* Ccap_2.1 (Código de Ensamblado: GCF_000347755.2) provisto por Papanicolaou et al. (2016). Para el alineamiento de secuencias se empleó el paquete estadístico TopHat (Trapnell et al., 2009), disponible para el *software* R. La tasa de cambio se calculó como la relación Grupo A sobre Grupo B.

Cabe mencionar que en un primer análisis se compararon las lecturas obtenidas con el genoma de *Drosophila melanogaster* (Código de Ensamblado: dmel-all-gene_extended2000-r6.21) provisto por la base de datos *Flybase* (wiki.flybase.org). La razón fue que al inicio de esta tesis no se disponía de acceso a la base de datos de *C. capitata*. En la comparación con *D. melanogaster* sólo se obtuvo un 65% de identidad de secuencia. El 35% restante correspondería a genes propios de *Ceratitidis capitata* que

hubieran quedado sin mapear. Este resultado indicó que al menos un 35% de los transcritos difieren entre *Drosophila melanogaster* y *Ceratitis capitata*.

Análisis general de la expresión diferencial de genes

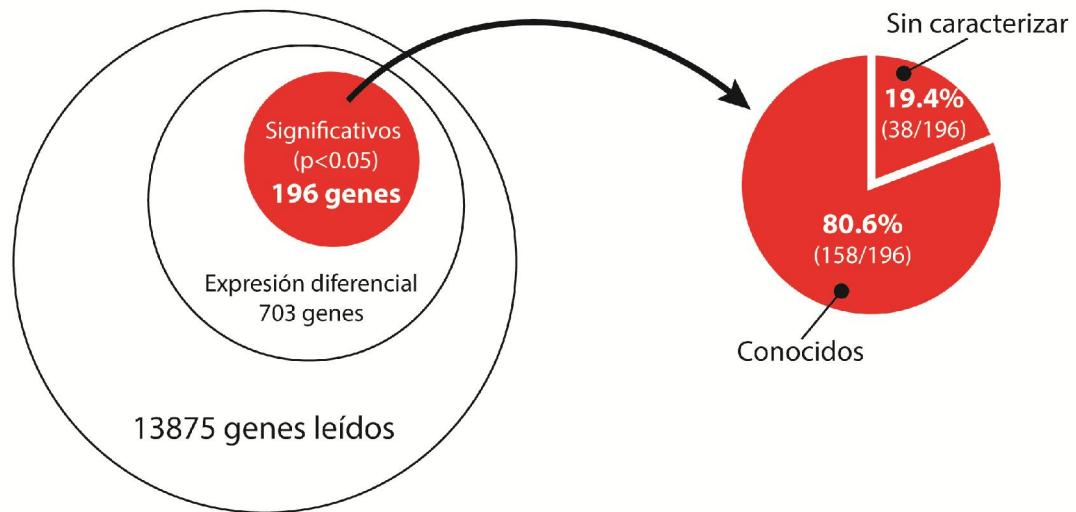
Se obtuvo lectura de 13875 genes, de los cuales 703 (5.07%) tuvieron expresión diferencial. Del grupo de 703 genes, sólo 196 (1.41% del total) tuvieron una expresión diferencial significativa en base al criterio adaptado ($p < 0.05$) (Figura 57-A). A partir del código de identificación de genes que arrojó la alineación con el genoma de referencia de *C. capitata*, se realizó manualmente una búsqueda en la base de datos *Genbank* (NCBI) (tabla suplementaria 1, pág. 212). De los 196 genes, 158 están caracterizados o al menos se encuentran identificados en la base de datos *Genbank* como “nombre predicho” a partir de homología de secuencia y/o familia de dominios conservados. Los 38 genes restantes con expresión diferencial carecen de homología y no pueden ser asociados a ninguno conocido.

En la Figura 57-B se aprecia que en el Grupo A (muchas caídas espontáneas supinas) registramos que del total de los 196 genes (100%) con expresión diferencial significativa ($p < 0.05$), 144 genes (73.5%) estaban sobreexpresados y 52 genes (26.5%) estaban subexpresados.

Dentro del grupo de 52 genes subexpresados (100%), y por tanto sobre expresados en el grupo B (pocas caídas supinas), se registró que los machos con un gran número de caídas espontáneas supinas (grupo A) tuvieron una subexpresión mayor a las 2.5 veces en el 17.3% de los genes registrados (9 de 52 genes), mientras que el 82.7% restante de los genes tuvieron una subexpresión entre 1.5 y 2.5 veces (43 de 52 genes) (Figura 57-B).

Por otro lado, dentro del grupo de 144 genes sobreexpresados (100%) se registró que los machos con un gran número de caídas espontáneas supinas (grupo A) tuvieron una sobreexpresión mayor a las 2.5 veces en el 9% de los genes registrados (13 de 144 genes), mientras que el 91% restante de los genes tuvieron una sobreexpresión entre 1.5 y 2.5 veces (131 de 144 genes) (Figura 57-B).

A Expresión diferencial de genes



B Genes con expresión diferencial significativa (196)

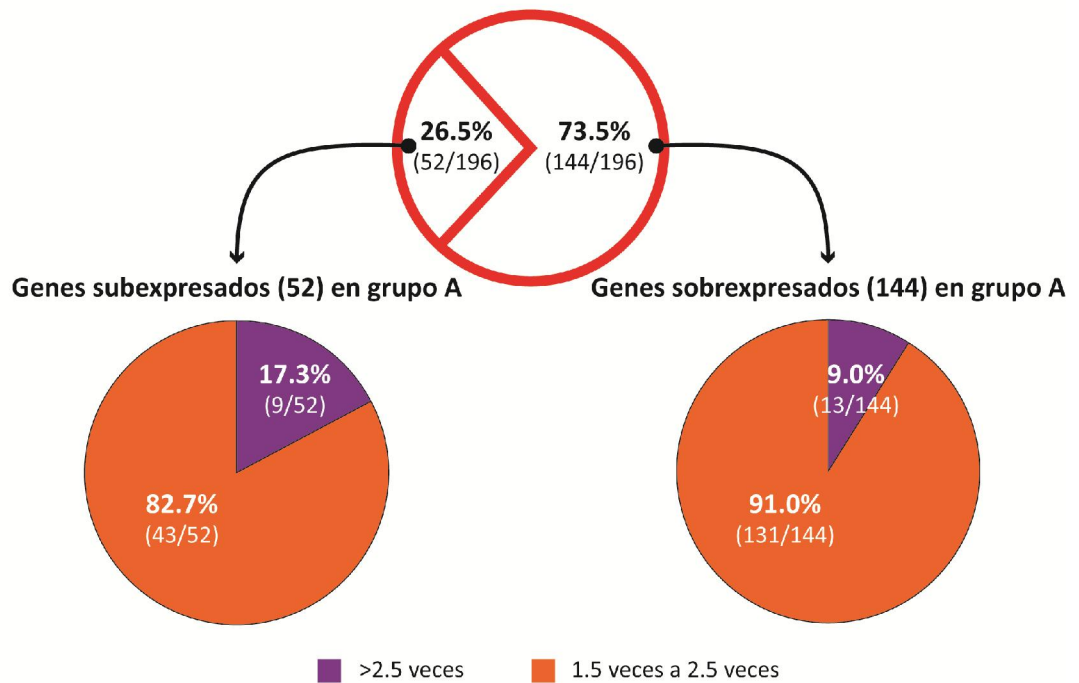


Figura 57. Representación gráfica del porcentaje de genes con expresión diferencial. **A.** contabilización general de la expresión diferencial de genes. **B.** Genes con expresión diferencial significativa. La tasa de cambio se calculó como la relación **grupo A / grupo B**. **Grupo A:** alto número de caídas supinas, **Grupo B:** Bajo número de caídas supinas.

Expresión diferencial en grupos de genes de C. capitata

Luego de la identificación de genes con expresión diferencial a partir del uso de la base datos de *Genbank* (NCBI) se los agrupó según su función molecular y proceso biológico en el cual intervendría (tabla suplementaria 2). Para ello se utilizó el nombre de anotación de los genes de *C.capitata* en *Genbank* y se lo introdujo en la base de datos *Uniprot*. Empleamos el filtro de resultados por organismo, utilizando la opción “mosca”, y se registró el dato de “función molecular” y “proceso biológico”. Esta búsqueda se realizó manualmente, ya que hasta donde sabemos no hay una base de datos disponible de *C. capitata* que nos lo permita realizar computacionalmente.

Nota: Como material adjunto (“genes_expresión_diferencial.xlm”) se muestra la tabla de genes con expresión diferencial significativa, con un acceso directo a la base de datos del Genbank para cada gen estudiado.

El análisis de ontología genética propuesta en la literatura de *Ceratitidis*, fue formar grupos ontológicos con identidad de secuencia de al menos 2 aminoácidos (Papanicolaou et al., 2016) o realizar un filtro donde sólo se tienen en cuenta aquellas secuencias aminoacídicas similares en un 50% o más (Nash et al., 2018), sin embargo hay una gran pérdida de datos. Nosotros realizamos un *megablast*, traduciendo todos los mensajeros de *Ceratitidis* y comparándolos contra la base de datos polipeptídica de *Drosophila melanogaster* (*Gene Ontology consortium site*). Este alineamiento arrojó una gran variedad de genes de *Drosophila*, aún mayor que la cantidad de transcritos presentes en nuestros resultados de *C.capitata*, proteínas que ni siquiera pertenecían a una misma familia de proteica. Observamos que en la mayoría de los casos más de un gen de *Drosophila* se lo asignaba a una secuencia de *C. capitata*, siendo escasas las secuencias correctamente asignadas. Fueron mayores los genes identificados y asignados a una “función molecular” y “proceso biológico” en forma manual a partir del empleo del nombre de anotación de los genes de *C.capitata* en *Genbank* y *Uniprot*.

Categorización de genes con expresión diferencial

Si bien la categorización por “grupo de genes” puede resultar ambigua, aquí se los ordenó según su rol biológico, lo que no quiere decir que el mismo gen no pueda participar de otra vía metabólica. La Figura 58 representa un mapa de análisis, que muestra el orden de los genes diferenciales que se analizarán a continuación.

❖ Genes diferenciales	
➤ Grupo detoxificante y/o estrés	
▪ Grupo detoxificante	pág.158
▪ Grupo de genes asociados a estrés	pág.159
➤ Sistema nervioso	
▪ Neuropéptido	pág. 163
▪ Neurotransmisor	pág. 165
▪ Fotoreceptor	pág. 167
▪ Canal iónico	pág. 167
▪ Factor de transcripción	pág. 168
▪ Citoesqueleto	pág . 169
▪ Neurodegeneración	pág. 169
➤ Inmunidad	pág. 170
➤ Olfato/gusto	pág. 172
➤ Metabolismo	pág. 173

Figura 58. *Mapa de análisis que resume a los grupos de genes con expresión diferencial detectados.*

Grupo detoxificante y/o estrés

Las enzimas que forman parte de la “maquinaria detoxificante y/o de estrés” también participan de otras reacciones metabólicas en el organismo del insecto. Sin embargo, como se detectaron en gran número y se identificaron grupos de genes que forman parte “fases de detoxificación” descritas en la literatura, se los ubicó en esta categoría. El mayor número de genes sobreexpresados en machos con gran número de caídas espontáneas supinas (machos Grupo A) pertenecieron al grupo de genes “detoxificantes” y asociados a estrés (tabla 11).

Grupo detoxificante

En animales del Grupo A encontramos 8 genes de la familia de **citocromos P450** con un rango de sobreexpresión mínimo de 1.52 y un máximo de 2.46 veces. Sorprendentemente, se encontraron 5 genes de la familia **UDP-glucuronosiltransferasas** con un rango de sobreexpresión mínimo de 1.68 y un máximo de 8.86 veces, este grupo fue el de mayor expresión diferencial de todos los genes analizados. También en este grupo se registraron 2 **esterasas** con una sobreexpresión de 2.26 y 2.19 veces (tabla 11).

La maquinaria “detoxificante” incluye 4 clases de enzimas que están conservadas desde insectos hasta humanos, estas son: cytochrome P450 monooxygenases (P450s), glutathione S-transferases (GSTs), carboxylesterases, and UDP-glucuronosyl transferases (UGTs), por citar las más importantes (King-Jones et al., 2006). La **fase I** de esta determinada por la presencia de enzimas cytochrome P450, mientras la **fase II** se caracteriza por la actividad de UGTs, esterasas y GSTs que transforman al compuesto tóxico aumentando su afinidad por el agua, facilitando la excreción.

Detoxificantes			
	Gen	Nombre	Sobreexpresión en grupo A (4 o más caídas)
Fase I	LOC101455730	cytochrome P450 b5	+1,520
	LOC101451659	cytochrome P450 6a14	+1,532
	LOC101451754	cytochrome P450 4s3	+1,600
	CcCYP12B4	cytochrome P450 12B4	+1,798
	LOC101459741	cytochrome P450 4ad1	+1,957
	LOC101450745	cytochrome P450 6a9	+2,107
	LOC101460097	cytochrome P450 4e1	+2,116
	LOC101449393	cytochrome P450 6d3	+2,465
Fase II	LOC101458243	UDP-glucuronosyltransferase	+1,685
	LOC110118417	UDP-glucuronosyltransferase 2C1	+1,736
	LOC101460759	UDP-glucuronosyltransferase 2B19	+2,156
	LOC101450646	UDP-glucuronosyltransferase 2A2	+2,662 *
	LOC101451322	UDP-glucuronosyltransferase 2B7	+8,812
	LOC101462136	esterase E4	+2,259
	LOC101462935	esterase-5B	+2,188
	LOC101450357	peroxisomal acyl-coenzyme A oxidase 1	+1,607
	LOC101453044	glutathione synthetase	+1,524
	LOC111591790	glutathione synthetase-like	+1,535

Tabla 11. Tabla de genes con expresión diferencial agrupados por su rol detoxificante.

*FDR menor que 0,05.

Grupo de genes asociados a estrés

Se ha detectado desde invertebrados hasta mamíferos, que al ser expuesto a sustancias tóxicas en el ambiente, presentan un aumento en el número y tamaño de sus peroxisomas como también alta actividad de la enzima **acyl-coenzyme A oxidase 1 peroxisomal** (Cajaraville et al., 2003). Entre las numerosas funciones de los peroxisomas, que se conserva en todos los organismos, se destaca su participación en la homeostasis de especies reactivas de oxígeno (EROs) y b-oxidación de ácidos grasos (Deb & Nagotu, 2017).

Nuestros resultados mostraron una sobreexpresión de 2 **glutathion-sintetasas** con una sobre expresión de 1.5 veces en moscas con un alto número de caídas supinas (tabla

11). La glutatión-sintetasa es una de las enzimas involucradas en la respuesta general a xenobióticos y estrés oxidativo (Njålsson, 2005).

También se determinó que en grupos de moscas con alto número de caídas supinas una sobreexpresión de 1.6 veces del gen que codifica para **acyl-coenzima A** oxidasa de peroxisomas en moscas con alto número de caídas supinas (grupo A), lo cual daría indicios de una mayor actividad peroxisomal detoxificante en este grupo de moscas.

Grupo de genes de importancia en el sistema nervioso

Entre los cambios, se detectaron 16 genes con función conocida en el sistema nervioso (Tabla 12). Siendo este el segundo grupo más numeroso luego del de de genes detoxificantes/estrés.

Dentro de este grupo de moscas supinas se encontraron 5 neuropéptidos, 5 genes involucrados en el metabolismo y captación de neurotransmisores, 1 foto receptor y 1 canal sodio. A continuación, para mayor claridad, se discutirán aspectos particulares de los genes reportados en sistema nervioso. Luego, como discusión general del capítulo, se hará un análisis integratorio.

Sistema nervioso		
Gen	Nombre	Sobreexpresión en grupo A (4 o más caídas)
Neuropéptido		
LOC101463018	short neuropeptide F (sNPF)	+2.080
LOC105665569	serine/threonine-protein kinasa (Dyrk1) ¿minibrain?	+1.640
LOC101449424	neuropeptide-like 1 (Nplp1)	+2,172
LOC101452369	PDF receptor	+1,996
LOC101457563	Diuretic hormone class 2 (¿DH1?)	+1,718
Neurotransmisor		
LOC101452254	Glutamate receptor	+2.350
LOC101454042	Glutamate receptor	+2.090
LOC101458686	Aspartate aminotransferase	+1,578
LOC101456969	sodium-dependent dopamine transporter	+2,670
LOC101462454	sepiapterin reductase	+2,529*
Fotoreceptor		
LOC101458403	cryptochrome-1	+1,768
Canal		
LOC101455258	pickpocket protein 28	+2,006
Factor de transcripción		
LOC101461665	transcription factor AP-1	+2,123
LOC101454866	Zinc finger protein squeeze	+1,749
Citoesqueleto		
LOC101452184	Formin-like protein CG32138 (Frl)	+1,564
LOC101449965	katanin p60 ATPase-containing subunit A1	+2,583

Tabla 12. Tabla de genes con expresión diferencial agrupados por su función conocida en sistema nervioso. *FDR menor que 0,05.

Neuropéptidos

El **neuropéptido-F-corto** (*short neuropeptide F*, **sNPF**) tuvo una sobreexpresión de 2.08 veces en machos con un gran número de caídas espontáneas supinas (grupo A).

La proteína **sNPF** está ampliamente distribuida en el sistema nervioso central de los insectos (Nässel, 2018) y modula la expresión del gen **minibrain** (Hong et al., 2012). Lee et al. (2008) demostraron que **sNPF** regula los niveles de trehalosa en hemolinfa, ya que activa la expresión de genes “insulin-like” (*Drosophila* insulin-like peptides, **dilps**). La inhibición de la expresión de este neuropéptido aumenta la supervivencia de las moscas *Drosophila* y aumenta los niveles de trehalosa circulante en hemolinfa (ver discusión general del capítulo).

Al mismo tiempo, este grupo de moscas A, tuvo una sobreexpresión 1.64 veces del mensajero que codifica para una proteína con un dominio conservado **serine/threonine-protein kinasa** perteneciente a la familia **dyrk1** (Becker & Joost, 1998).

En *D. melanogaster* se ha caracterizado una enzima de la familia **dyrk1** llamada “**minibrain**”. Lowe et al. (2019) describieron que la sobreexpresión del gen *minibrain* en el sistema nervioso produjo la reducción en la respuesta geotáctica y la longevidad de las moscas de *D. melanogaster*.

El gen **neuropéptido-tipo 1** (*neuropeptide-like 1*) codifica para una proteína conocida en *Drosophila* como **Nplp1**, tuvo una sobreexpresión de 2.172 veces en machos con un gran número de caídas espontáneas supinas (grupo A).

El **Nplp1** es un neuropéptido, que en respuesta a estrés, tiene función como ligando de receptor tipo guanilato ciclasa. La activación de este receptor aumenta los niveles de GMPc y modula la activación de la respuesta inmune innata por la vía **IMD** (**IMD**, conocida como vía de *inmunodeficiencia* en *Drosophila*) donde tras la activación de

la proteína **Relish** se activan los niveles de expresión de péptidos antimicrobianos (Overend et al., 2012). En el cerebro, este neuropéptido se expresa en células nerviosas relojeras conocidas como neuronas dorsales-tipo 1 (**DN1**), que se conectan con otro clúster de células relojeras conocidas como neuronas ventro-laterales (**LNv**) que se caracterizan por expresar el neuropéptido **PDF** (*pigmental dispersor factor*) (Shafer et al., 2006).

La proteína **receptora de PDF** (PDF-R) es un receptor acoplado a proteína G que responde positivamente al ligando PDF y está sobreexpresado 1.996 veces en animales con alto número de caídas supinas.

A diferencia del neurotransmisor **PDF**, **PDF-R** se expresa en diversas neuronas además de las neuronas relojeras. Mertens et al. (2005) demostraron que si bien en su conjunto las neuronas relojeras modulan la ritmicidad de los comportamientos, mutaciones en **PDF-R** produce un descenso de la respuesta geotáctica de las moscas *D. melanogaster*. Sin embargo, aunque la respuesta geotáctica se vea severamente afectada por las mutaciones, los demás comportamientos no parecen verse afectados. Toma et al. (2002) demostraron que la respuesta geotáctica de insectos es especialmente sensible a la activación de la vía **PDF/PDF-R** y a mutaciones en el **gen criptocromo**.

Otro neuropéptido sobreexpresado fue la **Hormona diurética clase II** (1.7 veces en animales del grupo A).

El grupo de hormonas diuréticas, además de su regulación del agua han sido relacionadas con la regulación del ritmo circadiano y el sueño, ya que se expresan en células **LNv** y **DN1** (Abruzzi et al., 2017). Kunst et al. (2014) demostraron que la hormona diurética estimula la actividad diurna de la mosca *D. melanogaster* y funciona río debajo de la propagación del ritmo de la proteína **PDF**. Por su parte, Goda et al. (2016) demostró la importancia conjunta de la **hormona diurética** y **PDF** en la actividad de *D. melanogaster*, en respuesta a la diferencia de temperatura entre día y noche.

Neurotransmisores

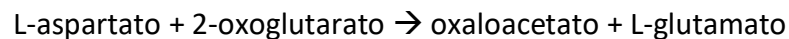
Metabolismo del glutamato

Se detectaron 2 **receptores glutamato** de la familia ionotrópica que tuvieron alta sobreexpresión en moscas macho con gran número de caídas espontáneas supinas, donde el gen LOC101452254 se expresó 2.35 veces y el LOC101454042 2.09 veces.

Ambos genes están anotados en la base de datos de *Genbank* con el mismo nombre genérico (receptor glutamato ionotrópico) pero para dos locus: LOC101452254 y LOC101454042.

La proteína **aspartato aminotransferase** estuvo sobreexpresada 1,578 veces en animales del grupo A.

Es una enzima que participa en la biosíntesis de **L-glutamato** a partir de la catálisis de la siguiente reacción:



El glutamato es uno de los principales neurotransmisores en insecto, en el cerebro se expresa en ciertas **LNs**, en lámina (**L**) del ojo (células **L1** y **L2**) y en **DN1a** (Kolodziejczyk et al., 2008; Nässel, 2018). A su vez, desde la zona dorsal del cerebro descienden axones que inervan circuitos motores del **VNC** (*ventral nerv cord*) que también son glutaminérgicos (Nässel, 2018). Mutaciones tanto en la síntesis de glutamato como en sus receptores causan desarreglos neuronales y descoordinación del movimiento (Featherstone et al., 2002).

Metabolismo dopamina

La **sepiapterine reductasa** es una enzima presente en todos los animales y estuvo sobreexpresada 2.529 veces en moscas con alto número de caídas supinas.

Esta enzima participa de una reacción óxido-reducción, donde a partir del 6-pyruvoyl-tetrahydropterin (PTP) se obtiene **tetrahydrobiopterina (BH4)**. Este producto de reacción participa en la síntesis de dopamina en neuronas dopaminérgicas, en donde para la conversión de tirosina a L-dopa, la enzima tirosine hidroxilasa (TH) necesita como cofactor al **BH4**. Luego la enzima AAAD (*aromatic amino acid decarboxylasa*) cataliza la reacción donde la L-dopa pasa a dopamina (Daubner et al., 2011). En humanos la deficiencia de **BH4** produce deterioro neurológico, desordenes motrices y longevidad reducida (Bonafé et al., 2001). También se lo ha asociado a enfermedades neurodegenerativas tempranas como el Parkinson juvenil (Clot et al., 2009).

El gen **transportador de dopamina sodio-dependiente** (sodium-dependent dopamine transporter, **DAT**) está sobreexpresado 2,670 veces en moscas con alto número de caídas supinas, al igual que la **sepiapterin reductasa** (Tabla 12).

El gen **DAT** en codifica para un co-transportador de dopamina y el catión sodio (tipo simportador). Es muy importante en la homeostasis dopaminérgica, ya que regula los niveles de dopamina en el espacio sináptico, enviando la dopamina desde el espacio sináptico hacia el citoplasma sináptico. La pérdida de actividad de este co-transportador incrementa la concentración extra neuronal de dopamina y está asociada a fenotipos comportamentales tales como hiperactividad y perdida del sueño tanto en insectos como en vertebrados superiores (van der Voet et al., 2015).

Fotoreceptor

El gen **criptocromo (Cry)**, que codifica para una proteína del tipo pterin/flavin y estuvo sobreexpresado 1,768 veces en moscas del grupo A.

Cry es foto receptor sensible a la luz azul y está involucrado en la traducción de la señal de luz del medioambiente a neuronas circadianas en insectos (Ceriani et al., 1999). En cerebro de moscas, **Cry** se expresa en **LNv** y **DN-1** (Benito et al., 2008). Como ya se mencionó las moscas mutantes para en el gen **Cry**, como así también para el gen **PDF-R**, tienen reducción de la respuesta geotáctica (Toma et al., 2002).

Canal de sodio

En Los machos con gran número de caídas espontaneas supinas el gen ***pickpocket-28*** presentó una sobreexpresión de 2.0 veces.

Se ha inferido que el gen ***pickpocket*** en *D. melanogaster* sería un canal de sodio, implicados en la detección de agua e ingesta y que se expresa en células nerviosas gustatorias (Cameron et al., 2010; Chen et al., 2010). Las ***pickpocket***, en particular la 23 y 28, también están relacionadas con la discriminación y/o inhibición del comportamiento de cortejo en drosófilidos (Thistle et al., 2012).

Factores de transcripción

La proteína ***squeeze*** tuvo una sobreexpresión de 1.749 veces en moscas del grupo A.

Esta proteína tiene un dominio tipo dedo de zinc y es un factor de transcripción muy importante en el sistema nervioso de los insectos, ya que controla la proyección neuronal otorgando identidad neuronal y estructura axonal y/o dendrítica (Komiya & Luo, 2007). Mutaciones en este gen produce defectos en la movilidad del insecto, tanto en adulto como en larva (Félix et al., 2007).

El gen **AP-1** codifica está sobreexpresado 2.123 veces en moscas del grupo A.

Es un factor de transcripción que contiene sitio de unión a ADN y sitio de reconocimiento a ARN polimerasa II. Mutaciones en este gen *Drosophila* produce anomalías neuro-anatómicas generales. Particularmente en cerebro produce alteraciones en la sinapsis y estructura dendrítica, como así también desarreglos en la topología de células receptoras visuales (rabdómeros) del ojo (Franciscovich et al., 2008).

Citoesqueleto

El gen **Formin like** esta sobreexpresado 1.564 veces en moscas del grupo A.

Este gen pertenece a una familia de proteínas que regulan la organización del citoesqueleto, participando en la polimerización de filamentos de actina. Mutantes drosofílicos para esta familia de proteínas afectan negativamente el tendido axónico, produciendo desarreglos estructurales de los cuerpos pedunculados (centros integradores del aprendizaje, memoria y locomoción de insectos) (Dollar et al., 2016).

El gen **Katanin p60 ATPase-containing subunit A1** (Kat60), que codifica para una proteína con función de organización microtubular, está sobreexpresada 2,583 en moscas del grupo A.

Los bajos nivel de expresión Kat60 en neuronas de *D.melanogaster* produce un incremento de la arborización dendrítica, por el contrario la sobreexpresión de Kat60 resulta en una reducción (Mao et al., 2014).

Grupo de genes ubicuos pero de importancia en neurodegeneración

Un grupo de genes ubicuos en células de moscas, pero con especial importancia en sistema nervioso, fueron el factor de transcripción IF-2 y la proteína TER94 (tabla 13).

Sistema nervioso			
Gen	Nombre	Expresión en A (4 o más caídas)	Expresión en B (0 y 2 caídas)
LOC101455908	translation initiation factor IF-2		+2,433
LOC101458543	Transitional endoplasmic reticulum ATPase TER94	+1,650	

Tabla 13. Grupo de genes ubicuos en mosca pero de especial importancia en neurodegeneración.

El gen LOC101455908 lleva nombre de **factor de iniciación de traducción IF-2**, forma parte de un grupo de proteínas IF-2 involucrado en la traducción general de mensajeros. Este gen estuvo sobreexpresado 2.433 veces en moscas con bajo número de caídas supinas espontáneas (grupo B).

En enfermedades neurodegenerativas en humanos, como Parkinson, Alzheimer y Huntington los niveles de la proteína IF-2 en su forma activa están reducidos, produciendo un descenso general de la traducción general de mensajeros y una longevidad reducida (Kapur et al., 2017).

El gen **TER94**, que codifica para una proteína involucrada en la vía ubiquitin-proteasoma, estuvo sobreexpresado 1.65 veces en moscas con alto número de caídas supinas (grupo A).

Esta proteína forma parte del proteasoma de las células en general y es fundamental para la homeostasis proteica (proteostasis) (Brown et al., 2018). Mutantes drosófilidos disfuncionales para esta proteína, presentaron acumulación de polipeptidos mal plegados y/o agregados (similar a Alzheimer en humanos), como así también

desorganizaciones del árbol dendrítico en neuronas dopaminérgicas (Rumpf et al., 2011). Se ha determinado que células nerviosas próximas a morir tienen altos niveles de expresión de esta proteína y que su sobreexpresión activaría la vía apoptótica de células neuronales de insecto (Higashiyama et al., 2002).

Grupo de genes relacionados con Inmunidad

En la tabla 14 se puede observar que se encontraron 2 genes sobreexpresados en moscas con bajo número de caídas supinas (grupo B), estos fueron el gen **Persephone** y el gen que codifica para la proteína tipo **GILT-1**. En cambio, en moscas con alto número de caídas supinas (grupo A), se encontraron sobreexpresados el gen que codifica para la **proteína de unión a fosfatidiletanolamina** y el gen que codifica para la proteína **Deaf-1**.

Inmunidad			
Gen	Nombre	Sobreexpresión en grupo A (4 o más caídas)	Sobreexpresión en grupo B (0 y 2 caídas)
LOC101452492	phosphatidylethanolamine-binding	+4,334	
LOC101463086	serine protease persephone		+5,998
LOC101461694	GILT-like protein 1		+1,567
LOC101460769	deformed epidermal autoregulatory factor 1 (deaf-1)	+1,543	

Tabla 14. *Tabla de genes con expresión diferencial agrupados por su rol en inmunidad de insectos.*

La serin proteasa **Persephone** fue 6 veces mayor en animales del **grupo B**, siendo la de mayor expresión diferencial en este grupo (tabla 14).

Persephone es una serin-proteasa presente en hemolinfa de insectos (Ligoxygakis et al., 2002). Se activa ante una infección fúngica o bacteriana (Chamy et al., 2008), y dispara una cascada proteolítica donde su principal blanco conocido es la proteína **Spaetzle**, quien induce la transcripción de péptidos antimicrobianos a partir de la activación la cascada Toll (Stokes et al., 2015).

Otro gen con alta expresión fue el que codifica para la proteína la **phosphatidylethanolamine-binding (PEBP)** con una sobreexpresión de 4.3 veces en machos del **grupo A**.

La familia de proteínas del tipo **PEBP** son inhibidores de serin-proteasas (Hengst et al., 2001). Se sabe que en humanos las proteínas tipo PEBP regulan varias vías señaléticas, entre ellas la vía **NFk-B** (Yeung et al., 2001). El ortólogo de **NFk-B** en insectos es Relish, cuya vía señalética induce la activación de péptidos antimicrobianos (Kounatidis & Chtarbanova, 2018).

El gen LOC101461694 codifica para una proteína **tipo GILT-1** (*Gamma-interferon-inducible lysosomal thiol reductase*) y está sobreexpresada 1.6 veces en machos con pocas caídas supinas (grupo B).

La familia de proteínas tipo GILT está relacionada con la respuesta inmune tanto de vertebrados como en artrópodos, aunque sus estudios en estos últimos son muy escasos. En *D. melanogaster* se determinó que participa en la vía de respuesta inmune ante la infección bacteriana, incrementando sus niveles de expresión génica (Bogunovic et al., 2008). Kongton et al. (2014) sugirieron que la activación de GILT es una vía alternativa a la respuesta inmune clásica de mediada por Toll e Imd. Más recientemente se descubrió que GILT está presente en la saliva de mosquitos del género *Anopheles*, donde este interferón se une a la superficie del parásito *Plasmodium* e impide el libre movimiento del parásito (Schleicher et al., 2018).

El gen ***deformed epidermal autoregulatory factor 1*** (*deaf-1*) tuvo una sobreexpresión de 1.54 veces en moscas con moscas con más de 4 caídas supinas (grupo A). *Deaf-1* tiene un efecto sinérgico junto con Relish activando la expresión de genes inmunes (Reed et al., 2008).

Grupo de genes olfativo y gustativo

En la tabla 15 muestra los valores de expresión del grupo “Olfatorio/gustatorio”, grupo de genes relacionados con la interacción con el ambiente y otros insectos.

Olfativo y gustatorio			
Gen	Nombre	Sobreexpresión en grupo A (4 o más caídas)	Sobreexpresión en grupo B (0 y 2 caídas)
LOC101448620	general odorant-binding protein 19d		+2,216
LOC101462478	NADPH:adrenodoxin oxidoreductase, mitochondrial	+1,697	

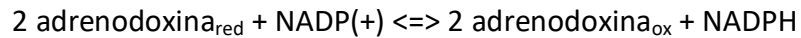
Tabla 15. Tabla de genes con expresión diferencial agrupados por su rol Olfatorio/gustatorio.

La **Obp19d** (proteína de unión a odorantes, **Obp**) resultó 2.2 veces mayor en insectos con pocas caídas supinas (grupo B).

Las proteínas de la familia Obp, junto con las proteínas “receptoras de odorantes” (*odorant receptor*, OR) son consideradas cruciales para la sensibilidad y especificidad de la olfacción en insectos (Larter et al., 2016). La Obp19d es la proteína de la familia Obp de mayor expresión en antena, mayoritariamente en la superficie anterior del tercer segmento antenal (Larter et al., 2016), en palpos maxilares, en las células de la base de los pelos del gusto en la proboscis y cara interna de la cabeza (Pikielny et al., 1994). Esta localización sugiere que puede estar vinculado con no solo con feromonas o volátiles de largo alcance sino con las de mediano y/o corto alcance. Arya et al. (2010) determinaron que la expresión del gen Obp19-d en la mosca *D. melanogaster* está correlacionado con la expresión de numerosos genes asociados a desarreglos neuromotores, con reducción en la respuesta geotáctica, locomoción y longevidad (ver discusión).

Otro gen de expresión diferencial fue el que codifica para la proteína **NADPH-adrenodoxina oxidoreductasa (dare)**, con una sobreexpresión de 1.7 veces en machos gran número de caídas espontáneas supinas (grupo A).

Esta enzima cataliza la oxidación de la oxidación de la adrenoxina:



La enzima **dare** es el principal dador de electrones en la cadena de transfencia de electrones p450 mitoconcrial y participa en la síntesis de hormonas esteroideas (incluyendo a 20-hidroxiectdisone)(Freeman et al., 1999). Mutaciones en este gen, no solo causan alteraciones en la síntesis de esteroides, sino que altera el comportamiento de respuesta olfatoria y desencadena desarreglos neuronales en todo el sistema nervioso central de moscas adultas de *D.melanogaster* (Freeman et al., 1999).

Metabolismo energético

Se detectaron al menos 6 genes con expresión diferencial asociados al metabolismo energético, en particular vinculadas con el metabolismo de azúcares (Tabla 16).

Los machos del grupo A tuvieron una sobreexpresión de los genes que codifica para: la proteína **Tret1** (facilitadora del transporte de trehalosa) en 1.56 veces, proteína **alpha, alpha-trehalose-phosphate sintasa** en 1.67 veces y la proteína **aldosa 1-epimerasa** en 1.70 veces (Tabla 16).

Por otro lado, los machos del grupo B (pocas caídas espontáneas supinas) tuvieron una sobreexpresión de los genes que codifica para: la proteína homologa a **Tret1-2** (facilitadora del transporte de trehalosa) en 1.59 veces, la proteína transportadora de azúcar **Sweet1** en 1.51 veces y la fosfoenolpyruvato carboxikinasa en 3.15 veces.

Metabolismo energético			
Gen	Nombre	Expresión en A (4 o más caídas)	Expresión en B (0 y 2 caídas)
LOC101449049	facilitated trehalose transporter Tret1-2 homolog		1,590
LOC101449133	facilitated trehalose transporter Tret1	1,559	
LOC101461057	alpha,alpha-trehalose-phosphate synthase [UDP-forming]	1,669	
LOC101459804	sugar transporter SWEET1		1,511
LOC101448967	aldose 1-epimerase	1,698	
LOC101458268	phosphoenolpyruvate carboxykinase [GTP]		3,150

Tabla 16. *Tabla de genes con expresión diferencial agrupados por su rol en el metabolismo energético.*

7.4.2 Parte B: Corroboración de expresión diferencial por PCR en tiempo real

Mediante el empleo de la técnica de secuenciación masiva, hemos detectado que entre moscas con alto y bajo número de caídas espontáneas supinas, hubo una pequeña fracción de genes con expresión diferencial significativa que corresponde al 1.4% del total genes leídos (196/13875).

Tras todo el análisis y descripción anterior se destacaron 2 grupos que resultaron de nuestro especial interés: 1. Grupo de genes con rol biológico en respuesta detoxificante y de estrés, y 2. Grupo de genes con particular función biológica en sistema nervioso, en especial aquellos genes con implicancia en la morfología de las células nerviosas y/o locomoción en insectos.

Por lo tanto para corroborar de los resultados bioestadísticos de la secuenciación masiva (RNAseq), se realizó un análisis complementario de expresión diferencial por PCR en tiempo real, poniendo especial interés en aquellos grupos de genes resaltados.

Genes antioxidantes

En distintos trabajos de nuestro laboratorio, determinamos la relevancia que tienen las especies reactivas de oxígeno (EROs) en el deterioro funcional de la mosca *C. capitata*, y en particular su efecto en el descenso de la respuesta geotáctica y capacidad dispersiva (Berni et al., 2003; Bochicchio et al., 2017; Bochicchio, 2012; Pujol-Lereis et al., 2010; Pujol-Lereis, 2006). Dentro de la respuesta antioxidante clásica, la catalasa junto con la familia de enzimas superóxido dismutasa (SOD) y las glutatión reductasa y transferasa, forman la principal barrera antioxidante de los organismos en general y de los insectos en particular.

Como el grupo de genes con rol detoxificantes/estrés tuvo una sobreexpresión en animales con alto número de caídas supinas, se corroboró la expresión de genes antioxidantes clásicos a partir del empleo de la técnica de PCR en tiempo real.

Durante la secuenciación masiva de transcriptos, presentada aquí en esta tesis, determinamos que muchos de los genes conocidos por su actividad antioxidante tuvieron una amplificación desbalanceada entre réplicas, como fue el caso de la catalasa. En la tabla 17 se puede observar que en el Grupo A la catalasa tuvo una variación del 25% entre réplicas, mientras que en el Grupo B tuvo una variación del 26%. El análisis de RNAseq es sensible a estas variaciones entre réplicas y afectó en la detección de diferencias significativas entre el Grupo A y B. Sin embargo la catalasa tuvo un 40% mayor expresión en el Grupo de moscas con mayor número de caídas supinas espontáneas, mientras que la SOD-Zn/Cu y la SOD-Mn fueron similares (1,0 y 0,9 respectivamente).

Nombre	ID	Número de lecturas								Nro. lecturas promedio Grupo A/ Grupo B
		Grupo A (4 o más caídas)				Grupo B (0 y 2 caídas)				
		Rep.1	Rep.2	Rep.3	C.V.%	Rep.1	Rep.2	Rep.3	C.V.%	
SOD Zn/Cu	loc101451855	35939	35257	27211	15%	32577	34740	29021	9%	1,0
SOD-Mn	loc101455598	16366	12532	11399	19%	16263	14914	12923	11%	0,9
catalasa	loc101461305	7715	5980	9834	25%	7391	4506	5409	26%	1,4

Tabla 17. Lecturas obtenidas del estudio transcriptómico por RNAseq para los genes SOD1, SOD2 y catalasa. C.V.%: coeficiente de variación porcentual, calculado como (D.E./promedio)x100.

Para corroborar la relación de expresión A/B se midió la expresión de los genes catalasa, SOD-Mn y SOD-Zn/Cu empleando la técnica de PCR en tiempo real (Figura 57).

Confirmamos que la catalasa tuvo una sobreexpresión en moscas con alto número de caídas supinas espontáneas (grupo A), siendo 4 veces más alto su nivel de expresión en moscas con alto número de caídas (Figura 59).

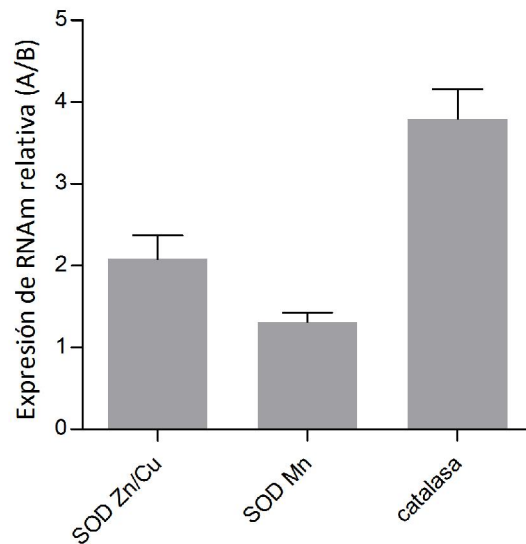


Figura 59. Cuantificación de genes de respuesta a estrés oxidativo, empleando la técnica de PCR en tiempo real. Se graficó el cociente entre los niveles de expresión de grupo de moscas A con el grupo de moscas B.

La enzima catalasa es una enzima presente en los peroxisomas de la célula. La alta expresión relativa del mensajero de catalasa correlaciona positivamente con la alta expresión del mensajero de la acyl-coenzima A registrado mediante la técnica de RNAseq (página 160, tabla 11). Se sabe que el aumento de expresión relativa de acyl-coenzima A está asociado con el aumento de número y tamaño del peroxisoma (Cajaraville et al., 2003).

Se determinó por PCR en tiempo real que la SOD Zn/Cu estuvo 2 veces más sobreexpresada en moscas con alto número de caídas supinas, mientras que la SOD Mn no mostró diferencias (Figura 59). La SOD Zn/Cu constituye aproximadamente más del 90% de la actividad total antioxidante de las células y tejidos en general en todos los organismos (Bogunovic et al., 2008), por lo tanto la alta expresión de este gen junto con la catalasa, en moscas con alto número de caídas supinas, sugeriría que este grupo de machos presentó un estado de estrés mayor al de los animales con bajo número de caídas supinas (grupo B).

Estudio de Genes “atáxicos” en moscas supinas

En la primera parte de este capítulo de tesis hemos detectado varios genes involucrados directa o indirectamente en remodelación neuronal, neurodegeneración y estrés; con implicancias en la motilidad y geotaxia. Como el supino es un comportamiento sutil, donde la mosca solo se diferencia del resto por permanecer invertida sobre su dorso unos segundos, decidimos explorar el patrón de supinez estudiando genes que están involucrados en ataxias, complementando los resultados de RNAseq.

Cuantificación de genes atáxicos

Los genes ATM, parkin y turtle fueron de especial relevancia en el estudio de ataxias, debido a su similitud entre el fenotipo comportamental informado en moscas *Drosophila* mutantes para estos genes y el comportamiento supino de *Ceratitis*. Detectamos la expresión de estos tres genes atáxicos en *Ceratitis capitata* (Figura 58). Determinamos que durante la secuenciación masiva estos tres genes tuvieron una amplificación desbalanceada entre réplicas. En la tabla 18 se puede observar que en el Grupo A el gen turtle tuvo una variación del 58% entre réplicas, mientras que en el Grupo B tuvo una variación del 50%. El gen parkin tuvo una variación del 37% entre réplicas, mientras que en el Grupo B tuvo una variación del 29%. Mientras que el gen ATM tuvo una variación del 21% entre réplicas, mientras que en el Grupo B tuvo una variación del 38%.

El análisis de RNAseq es sensible a estas variaciones entre réplicas y afectó en la detección de diferencias significativas entre el Grupo A y B. Sin embargo se observó una tendencia al aumento de los niveles de turtle en los machos del Grupo A en un 30%, un 40% de aumento del gen parkin y un 10% de aumento del gen ATM.

Nombre	ID	Número de lecturas								Nro. lecturas promedio Grupo A/ Grupo B
		Grupo A (4 o más caídas)				Grupo B (0 y 2 caídas)				
		Rep.1	Rep.2	Rep.3	C.V.%	Rep.1	Rep.2	Rep.3	C.V.%	
turtle	loc101457402	227	95	358	58%	202	79	254	50%	1,3
parkin	loc101461557	376	378	687	37%	411	230	384	29%	1,4
ATM	loc101460055	367	247	275	21%	392	185	258	38%	1,1

Tabla 18. Lecturas obtenidas del estudio transcriptómico por RNAseq para los genes *turtle*, *parkin* y *ATM*. C.V.%: coeficiente de variación porcentual, calculado como (D.E./promedio)x100.

Dada la relevancia antes comentada para estos genes atáxicos, corroboramos los resultados del RNAseq a partir de la cuantificación por PCR en tiempo real. Este nuevo estudio indicó que el gen *turtle* fue el único que mostró un aumento en más del doble de su expresión (2.24) en machos con una gran cantidad de caídas en posición supina (Grupo A) ($p=0.008$) (Figura 60-A). Este resultado reforzó el perfil de expresión diferencial obtenido en el RNAseq, donde se observó que el gen *turtle* aumentó su expresión un 30% en animales del grupo A (Figura 60-B).

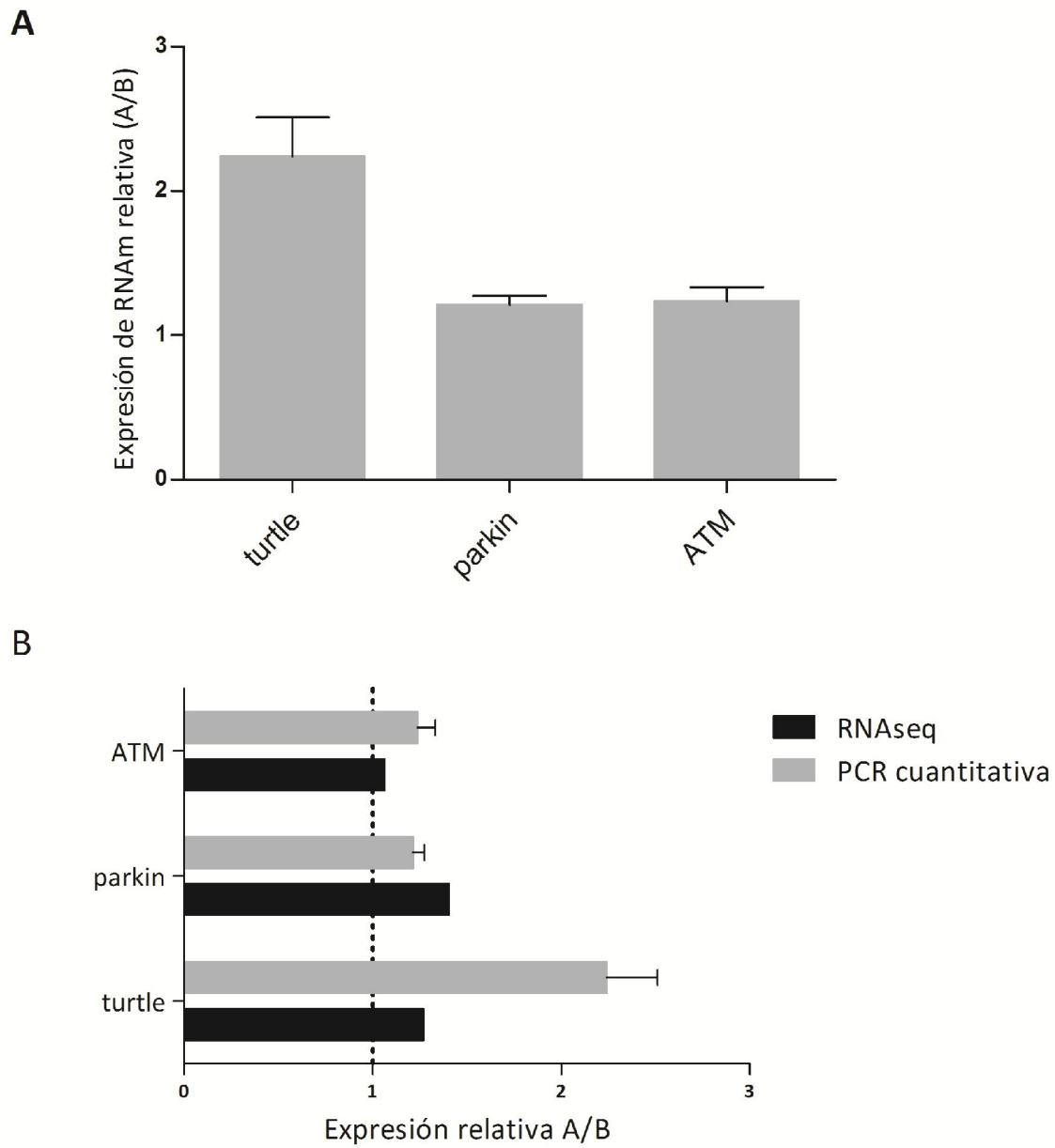


Figura 60. A. Cuantificación de la expresión génica de genes atáxicos, empleando la técnica de PCR en tiempo real. Se graficó el cociente entre los niveles de expresión de grupo de moscas A con el grupo de moscas B. **B.** diferencial de genes atáxicos, se compara el perfil de expresión medido por el método de PCR en tiempo real y el del RNAseq. Se muestran los valores relativizados de A/B. Las barras negras representan los valores de lecturas promedio A/B de la tabla 18.

7.4.3 Parte C: Estudios del gen turtle de Ceratitis capitata

Cuando se inició esta tesis el gen turtle era un gen totalmente inexplorado en *Ceratitis capitata*, la base de datos que facilita el NCBI para esta mosca y para este gen en particular, se trata de una recopilación bioinformática que se va actualizando a partir de depuraciones computacionales, que se obtienen a partir de putativos fragmentos de expresión provenientes de ensayos transcriptómicos masivos. Al momento de iniciar nuestros estudios (2014), en la base de datos *Genbank* sólo figuraba un transcripto del tentativo gen turtle con un largo de 4808pb (hoy llamado en la base datos como “turtle variante X1”). Al compararlo con la biblioteca de expresión génica de *Drosophila*, sólo se obtuvieron coincidencias con las 4 isoformas informadas por Bodily et al. (2001).

La Figura 61 muestra un esquema del alineamiento local de las secuencias informadas en *Drosophila* contra el putativo transcripto del gen turtle de *Ceratitis*. Bodily et al. (2001) informaron 4 isoformas o variantes de expresión del gen turtle en *Drosophila*, siendo la isoforma 1 la más corta y la 4 la más larga. Sin embargo las cuatro isoformas conservan una región entre los 58 y 710 pares de bases con 100% de identidad entre ellas, mientras que entre estas y el tentativo ARNm de *Ceratitis* tuvieron un 86% de identidad.

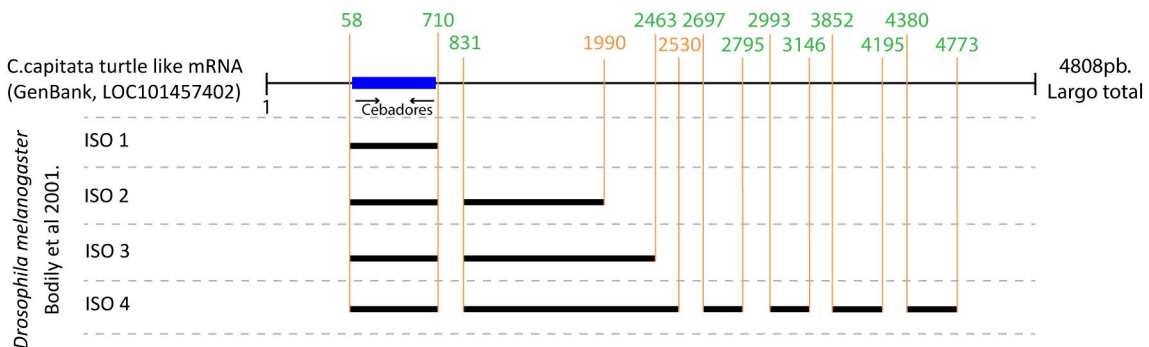


Figura 61. Diagrama de alineamiento de las variantes del mensajero del gen turtle de *Drosophila melanogaster* comparada con la primer secuencia reportada para el tentativo mensajero del gen turtle de *C. capitata* (largo 4808pb). ISO: Isoformas informadas por Bodily (2001). En verde se muestran las posiciones en pares de base (pb) donde alinearon los fragmentos del turtle de *Drosophila* (el número es en referencia al mensajero de *Ceratitis*). En azul se muestra la región amplificada y secuenciada para nuestra cepa Mendoza de *C. capitata*.

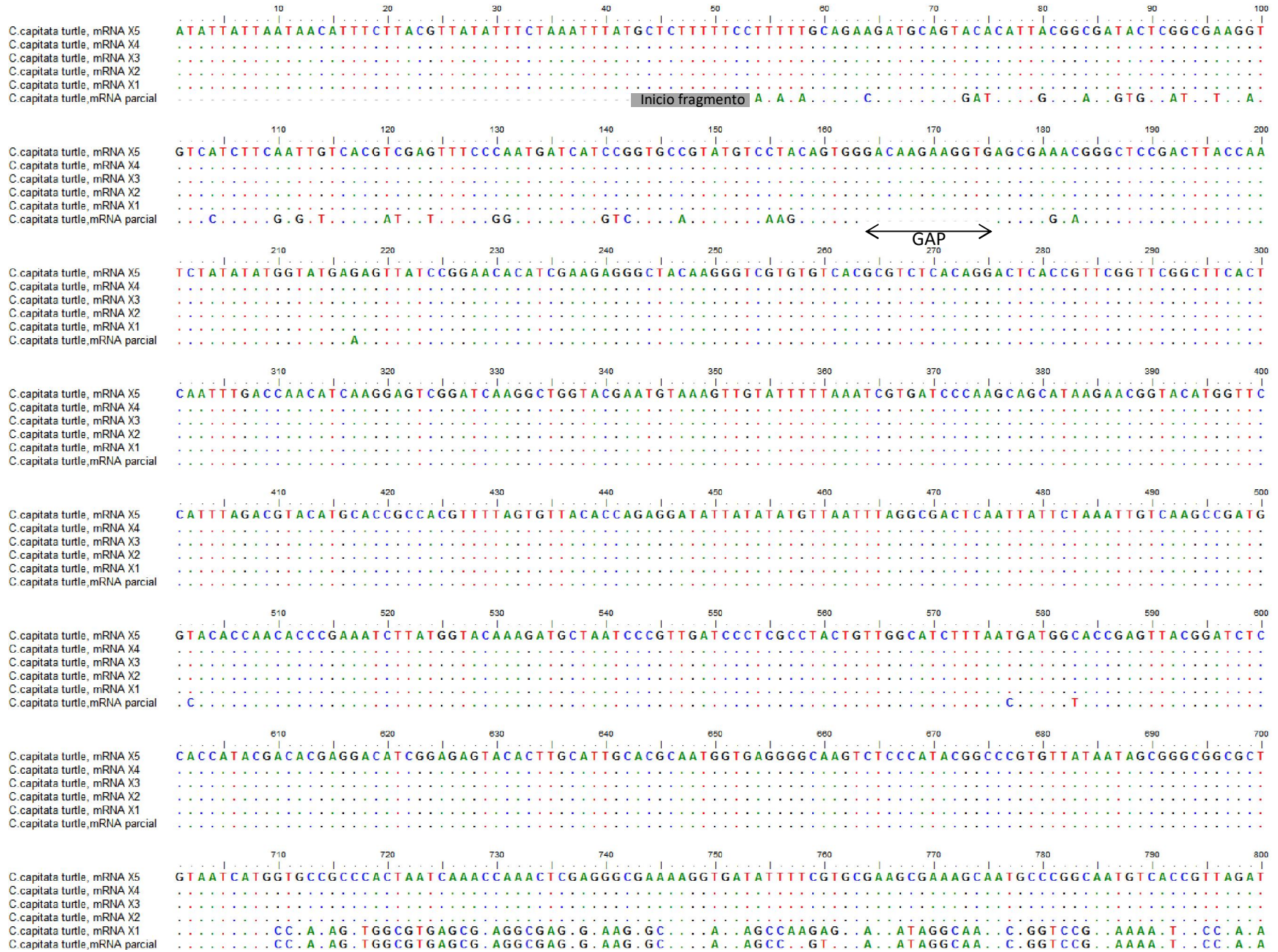
Nuestro primer objetivo fue estudiar si la aparente región conservada entre las 4 isoformas de *Drosophila* y el tentativo ARNm turtle de *Ceratitis* de la base de datos teórica (X1) se correspondía con el gen turtle de nuestra cepa de moscas de *Ceratitis capitata* Mendoza o si presenta alguna variante. Para ello se realizó una secuenciación directa a partir del diseño de cebadores específicos, franqueando la región que fue desde los 50pb hasta los 850pb del ARNm del tentativo gen turtle (ver materiales y métodos generales). Las muestras se obtuvieron a partir de homogenatos de cabeza de moscas de 5 días de edad, tomadas al azar de frascos poblacionales de machos vírgenes cepa Mendoza.

De los 800 pb esperados se obtuvo un fragmento específico de 753pb. No se tuvieron en cuenta los primeros nucleótidos de la secuencia obtenida tanto para el extremo 5' como del 3', ya que las lecturas del secuenciador fueron poco fidedignas en la asignación de los primeros nucleótidos (ver materiales y métodos). Al alinear nuestro fragmento secuenciado, con el tentativo fragmento de *Ceratitis*, se obtuvo una identidad del 93% y la presencia de un hiato o *gap* de 12 nucleótidos en nuestro fragmento en la posición 164-175pb (ver Figura 62).

Esta secuencia fue informada en el *Genbank* bajo el nombre "*Ceratitis capitata* turtle protein (tutl) mRNA, partial cds" con el código de referencia KR019778.1 (año 2015). Es hasta el momento de presentación de este trabajo, el primer y único antecedente en la base de datos de *C. capitata* que informa y corrobora la secuencia parcial del mensajero del gen turtle.

Luego de nuestro informe en el 2015, aparecieron 4 nuevas variantes de expresión (nuevamente predichas computacionalmente por el NCBI) variantes X2, X3, X4 y X5 (año 2017), que se agregaron a la lista junto con nuestra secuencia y la variante X1.

La Figura 61 muestra un alineamiento local de secuencias (blast) de los distintos mensajeros del gen turtle informados hasta el momento para *C.capitata* (2019). Sólo se muestra la región que alinean las 6 secuencias (1 a 1000pb). Se determinó que nuestro fragmento tuvo una identidad del 93.3% con el X1, y un 92.7% de identidad con las variantes X2, X3, X4 y X5.



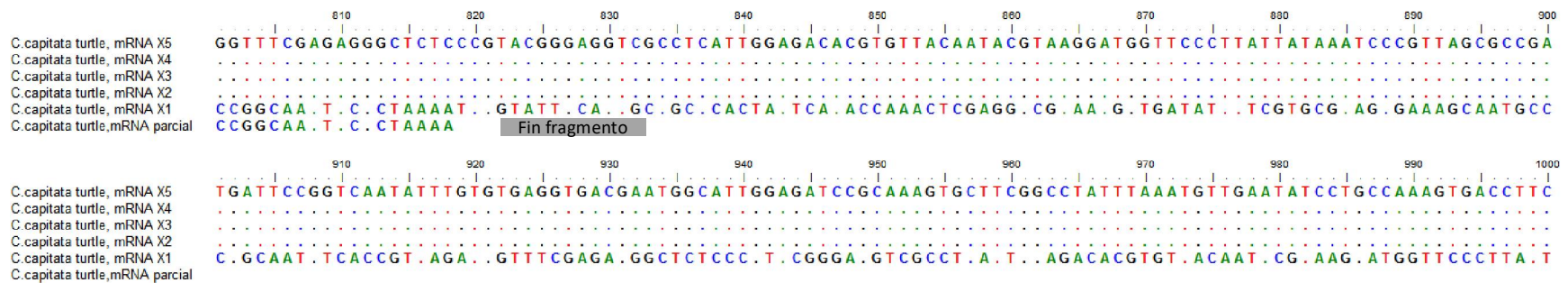


Figura 62. Alineamiento local de secuencias (Blast) de las distintas variantes del ARNm del gen turtle. Se alinean las secuencias predichas de los distintos variantes del gen turtle (X1 –X5), junto con nuestro fragmento secuenciado. Se muestra el alineamiento desde la posición 1 hasta la posición 1000pb, ya que comprende el fragmento de la posición 58 hasta el 710 conservado. El punto indica que el nucleótido se conserva en las 6 secuencias.

Silenciamiento de la expresión del gen turtle

Una vez secuenciado el fragmento conservado en todas las secuencias propias de nuestra cepa de *C. capitata* y haber determinado por dos técnicas independientes la sobreexpresión de este gen en moscas supinas, bloqueamos la expresión génica de turtle mediante la técnica de RNA de interferencia. El objetivo fue determinar si el descenso en los niveles de expresión se correlaciona con el aumento o descenso de observaciones de evento supino y si los parámetros comportamentales de actividad dentro del lek se ven alterados.

Diseñamos un ARN de interferencia (ARNi) específico a partir del fragmento secuenciado, con el objetivo de silenciar todas las variantes del gen turtle en cerebro de *C. capitata*. Bodily et al. (2001) informó que la mayoría de las mutaciones en el gen turtle de *Drosophila* son letales embrionales, por lo tanto se decidió suministrar el ARNi en el alimento de larvas durante el transcurso del primer y segundo estadio larval de *C. capitata*.

En ensayos preliminares se emplearon 30 larvas de estadio 1 alimentadas con el RNAi-turtle y 30 larvas mantenidas en condiciones normales cría (control). Se calculó el porcentaje de pupariación y emergencia de las moscas RNAi y controles sin RNAi. Determinamos que las moscas RNAi-turtle tuvieron un 93.3% (28/30) de pupariación, los controles 100% (30/30); mientras que la emergencia fue de un 96.4% (27/28) en moscas RNAi, un 3.6% menor que las moscas controles (100% emergencia en controles) (tabla 19). De las 27 moscas RNAi-turtle emergidas, 15 fueron hembras y 12 machos; mientras que en los controles fueron 16 hembras y 14 machos.

	RNAi-turtle	Control
Pupariación	28/30 (93.3%)	30/30 (100%)
Emergencia	27/28 (96.4%)	30/30 (100%)

Tabla 19. Contabilización de pupariación y emergencia de moscas tratadas con RNAi turtle.

Luego de transcurridos 3 días desde la emergencia de los adultos, se separaron los machos. Observamos que había animales RNAi-turtle con grandes dificultades

motoras, principalmente inmovilidad del segundo y tercer par de pata y alas. Sin embargo otras fueron aparentemente similares a los controles. Este resultado indicó que el silenciamiento del gen turtle mediante el suministro de RNAi en la comida durante el estadio larval fue suficiente para desencadenar descoordinaciones motoras en adultos macho jóvenes.

Respuesta geotáctica (RING) en moscas RNAi-turtle

Se formaron 2 grupos de 8 machos controles y 2 grupos de 8 machos tratados con RNAi-turtle. Al 5to día de edad se cuantificó la respuesta geotáctica mediante el ensayo de RING. En ensayos preliminares determinamos que las moscas RNAi-turtle tuvieron un descenso de alrededor de un 20% en la respuesta geotáctica comparadas con los controles (Figura 63).

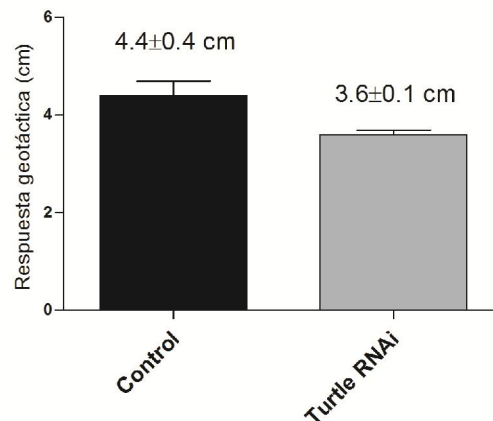


Figura 63. Respuesta geotáctica (RING) de moscas macho adultas de 5 días de edad. Se comparan moscas Controles con aquellas tratadas con RNAi-turtle durante larva. Media ± DE. Las barras de error indican el SEM.

Supervivencia de moscas RNAi turtle

Se armaron 4 grupos de 3 moscas macho RNAi turtle y 4 grupos de 3 moscas macho control, contenidos en frascos de 180ml cada uno, de forma tal de mantener el mismo número y volumen que el del lek mínimo de laboratorio. Se registró la mortalidad de los machos controles y tratados todos los días. Se determinó que la supervivencia máxima de las moscas tratadas con RNAi turtle fue de 43 ± 13.5 días mientras que en los controles fue de 30 ± 7 días (Figura 64). Sorpresivamente la supervivencia máxima de aquellos machos alimentados durante larva con RNAi turtle vivieron 13 días más que los controles. Las moscas tratadas con RNAi fueron más heterogéneas en el valor obtenido de longevidad máxima (coeficiente de variación 31,4%) mientras como era de esperar los controles fueron más homogéneos (coeficiente de variación 23,3%).

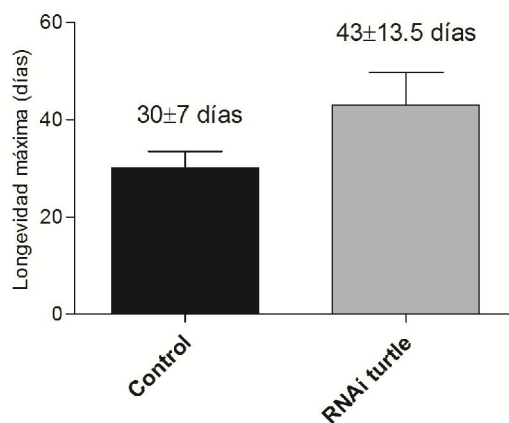


Figura 64. Longevidad máxima de moscas macho mantenidas en grupos de 3. Se comparan moscas Controles con aquellas tratadas con RNAi-turtle durante larva. Media±DE. Las barras de error indican el SEM.

La Figura 65 muestra una fotografía de una mosca RNAi-turtle (A-B) comparada contra un control (C-D). Ambas moscas fueron brevemente anestesiadas en hielo para poder colocarlas en posición supina y poder fotografiarla. La mosca RNAi-turtle, no

pudo darse vuela por sí sola; realizaba movimientos desorganizados de los pares de patas 1 (R_1+L_1) y 2 (R_2+L_2), manteniendo inmóvil el 3er par de patas (R_3+L_3) (Figura 65-A). Al ayudarla a reincorporarse a la posición prono con la ayuda de un pincel, se observó que si bien apoyaba sus 6 patas, caminaba inclinada hacia un lado y con dificultad, arrastrando su tercer par de patas que mantuvo inmóviles (R_3+L_3) (Figura 65-B). Por el contrario el control movió rápidamente sus 6 patas y se reincorporó a la posición prono ubicándose sobre sus 6 patas (Figura 65 C y D). Como material suplementario se adjunta video filmaciones de moscas RNAi-turtle con dificultades motoras y su control (RNAi_turtle.avi).

Del total de 28 machos que emergieron de los cultivos de larvas alimentados con RNAi turtle, 16 de se utilizaron para ensayos de respuesta geotáctica y los 12 restantes para ensayos de longevidad.

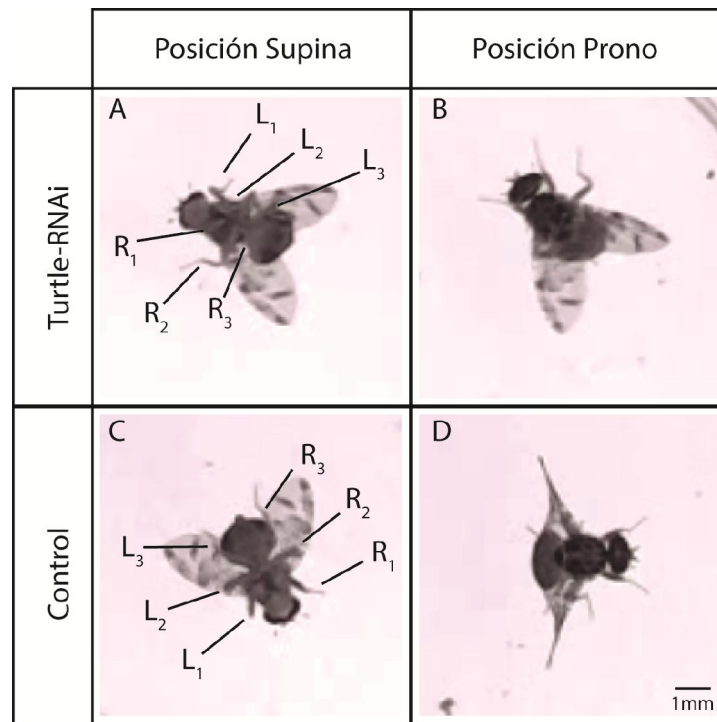


Figura 65. Fotografía de una mosca *Ceratitis capitata* RNAi-turtle en posición supina (A) y prono (B), comparada contra el control (C-D). **R:** pata derecha; **L:** pata izquierda; el subíndice indica la posición del segmento al cual pertenece la pata.

7.5 Conclusiones y discusión

Como resultado general de la secuenciación masiva en esta tesis, podemos observar que la cepa de laboratorio empleada (con más de 24 años de cría en el laboratorio) mantiene suficiente variabilidad genética como para revelar diferencias comportamentales en un *lek* experimental.

En comparación con *Drosophila*, los tefrítidos en general han sido poco caracterizados a nivel genómico. Hasta donde se sabe, el tamaño de genoma de *Ceratitis* es de 591Mb (rango CI: 577–605 Mb) mientras que el de otro tefrítido, evolutivamente cercano, *Bactrocera oleae*, es de 322 Mb (rango CI: 310–334 Mb) (Gomulski et al., 2008; Tsoumani & Mathiopoulos, 2012). Mientras que el tamaño del genoma de *D. melanogaster* es de 194 Mb (rango CI: 183–205 Mb). De los 14652 genes informados en la base de datos de *C. capitata*, logramos detectar 13875 genes, alineando el 94% del genoma. Por otro lado, el empleo como referencia de la base de datos de *Drosophila* redujo el porcentaje de ensamble al 65%, indicando que los genes expresados e informados en la base de datos de ambas moscas posiblemente difieren alrededor del 35%.

Nuestros resultados mostraron que el 1.41% de los genes tuvieron expresión diferencial significativa (196 significativos /13875 totales) en cabezas de machos supinos. Esto ratifica que la pequeña diferencia comportamental refleja perfiles de expresión casi idénticos, como era de esperar, pero que se pueden detectar cambios significativos. Detectamos grupos de genes con implicancia diferentes roles fisiológicos. Los grupos con más genes que cambiaron fueron: (1) detoxificantes y estrés, (2) sistema nervioso y neuroendócrino, que están íntimamente relacionado con: (3) grupos de genes de inmunidad innata, y (4) metabolismo de azúcares.

Análisis de expresión génica

Expresión de enzimas con rol en biotransformación de xenobióticos, implicancia en el estrés oxidativo y su efecto en la longevidad.

Resultó sorpresivo el hallazgo de 18 genes que en su acción conjunta se los conoce por su rol en la biotransformación de xenobióticos, todos con sobreexpresión en animales con alto número de caídas supinas espontáneas. Esto implicaría una activación del metabolismo ligado a estrés y/o actividad.

Todo compuesto que no es parte de la composición habitual del sistema de los organismos vivos, se conoce genéricamente como xenobiótico. Como ya se mencionó la biotransformación o detoxificación es el conjunto de procesos enzimáticos destinados a incrementar la hidrofilia del compuesto xenobiótico para facilitar su neutralización y eliminación.

La fase I se caracteriza por la actividad de los genes "P450", donde partir de reacciones de oxidación, reducción o hidrólisis, los xenobióticos son convertidos en productos más hidrosolubles a causa de la formación de nuevos grupos funcionales polares.

La fase II se caracteriza por reacciones de conjugación de azúcares, catalizada por la UGTs; conjugación de glutatión, catalizada por la GSTs y por la actividad de esterasas; aumentando así la polaridad de la molécula xenobiótica y su afinidad por el agua, facilitando la excreción.

Además de estos mecanismos clásicos en la vía de detoxificación, esta batería de enzimas tiene otras funciones y participan en otras rutas metabólicas que han sido poco exploradas.

Expresión de genes de la familia P450

El genoma de casi todos los insectos contiene gran número de genes “P450”, denominado por la nomenclatura actual como CYP (*cytochrome* P450). En particular, *Ceratitis capitata*, se caracteriza por tener una gran cantidad de genes que codifican para CYP, incluso supera al número de genes reportados en la base de datos de *Drosophila* (*Flybase*) (103 genes CYP reportados en *C. capitata* vs 88 en *D. melanogaster*).

Los CYP son una de las superfamilias de genes más grande. Participan en numerosas vías enzimáticas: biosíntesis de ecdisteroides y hormona juvenil (esencial para crecimiento del insecto, desarrollo y reproducción); metabolismo de insecticidas, ya sea en la bioactivación o detoxificación, siendo este último de importancia en la resistencia a insecticidas (Papanicolaou et al., 2016). Junto con la acyl-CoA, las CYP participan en la síntesis de ésteres de hidrocarburos, donde por ejemplo se obtiene la feromona sexual de dípteros (Z)-9-tricoseno. Esta última reacción se ha detectado principalmente en antena de machos (Feyereisen, 1999).

Dentro de las diversas funciones de las enzimas CYP, se ha demostrado que los niveles de expresión de CYP6a20 (enzima presente en antena y palpos) está asociada al contexto social y nivel de agresión en moscas macho de *D. melanogaster* (Dierick & Greenspan, 2006; Shultzaberger et al., 2019; Wang & Anderson, 2009; Wang et al., 2008). La familia CYP6 es la más polimórficas de *Ceratitis capitata* (y es el doble de grande que la de *Drosophila*) e incluso la subfamilia CYP6a es la más diversa dentro de la familia CYP6 (Papanicolaou et al., 2016).

Nuestros resultados demostraron que los machos de *Ceratitis* que tuvieron un alto número de caídas espontáneas supinas en el *lek* experimental presentaron una alta sobreexpresión de mensajeros de enzimas CYP, donde de los 8 CYP registrados, 3 fueron de la familia CYP 6 (CYP6d3, CYP6a14 y CYP6a9).

No existe un citocromo en la base de datos de *Ceratitis capitata* llamado CYP6a20, sin embargo esta proteína de *Drosophila* tiene un 48.53% identidad de

secuencia polipeptídica con la CYP6a14 y un 47.12% de identidad de secuencia con la CYP6a9 de *Ceratitis* (blastx).

Determinamos que las moscas con alto número de caídas espontáneas supinas, que son aquellas con alta probabilidad de muerte temprana, son las que tienen mayor expresión de las enzimas de CYP6A9 y CYP6a14. En concordancia con Wang et al. (2008) los niveles de expresión de la subfamilia CYP6a se ven igualmente modificados dentro de un contexto social con peleas entre moscas, como es el caso de nuestro *lek* experimental. Wang y sus colaboradores sostienen que los altos niveles de CYP6a20 en *Drosophila* correlacionan negativamente con el nivel de agresión del insecto. Nuestros resultados coincidieron con los reportados por Wang ya que las moscas con un menor número de caídas supinas fueron las que presentaron menores niveles expresión de CYP6a9 y CYP6a14 en comparación con aquellos machos del *lek* con alto número de caídas.

Estrés oxidativo

La alta expresión de enzimas CYP llevaría a una alta presencia y actividad enzimática de las distintas CYP sobreexpresadas en moscas macho supinas. Se sabe que la alta actividad de enzima CYP junto con las citocromos mitocondriales son la mayor fuente de especies reactivas de oxígeno (EROS) (Zangar et al., 2004). La Figura 66 muestra el ciclo oxido-reducción del grupo hemo que tienen todas las CYP eucariontes. Reacciones secundarias de protonación son las que producen las especies reactivas como el anión superóxido ($O_2^{\bullet -}$) y peróxido de hidrógeno (H_2O_2) (Davydov, 2001; Zangar et al., 2004).

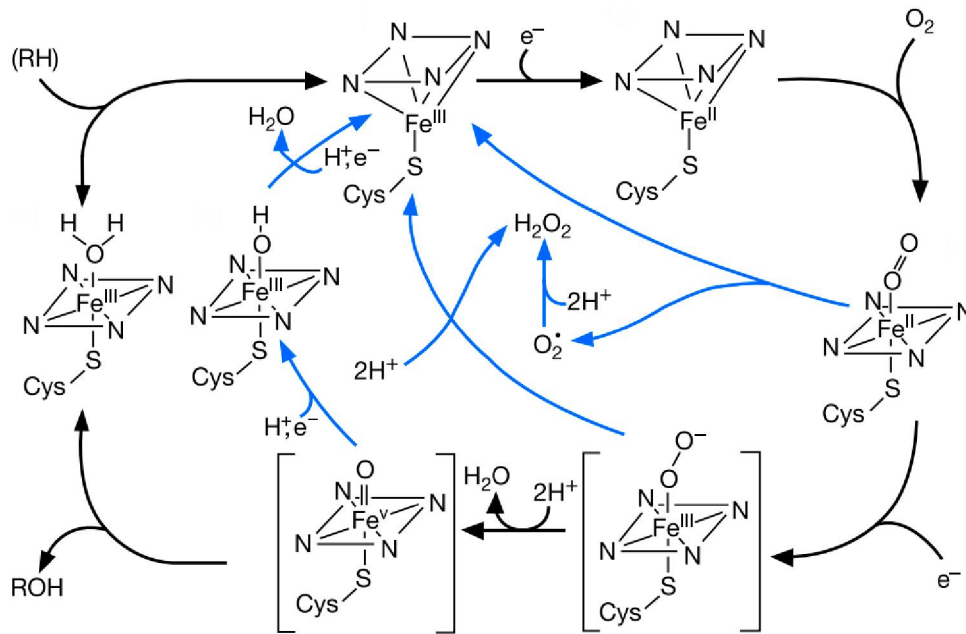


Figura 66. Ciclo oxido-reducción del grupo hemo de las CYP. En negro se señalan las reacciones clásicas y en azul se representan las reacciones cruzadas de protonación responsables de la producción de especies EROS. Tomado de (Davydov, 2001).

La actividad de las CYP requiere de oxígeno y de la coenzima NADPH (Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato) (Davydov, 2001). Consistentemente, hemos detectado la sobreexpresión de la adrenodoxina oxidoreductasa (mitocondrial, LOC101462478) +1.69 veces en machos supinos, y por lo anterior expuesto está ligado a la alta actividad del grupo detoxificante/estrés en machos supinos. Hemos detectado tanto por secuenciación masiva como por PCR la alta expresión del gen catalasa. Este resultado fue consistente con la alta actividad de CYPs y la producción de especies reactivas de oxígeno.

UDP-Glucuronosiltransferasas

Las UDP-glucuronosiltransferasas (UGTs) son proteínas unidas a membranas de retículo endoplasmático con actividad en el lumen del retículo de todos los animales. Las UGTs catalizan la conjugación de un azúcar a moléculas lipofílicas, generando productos más solubles en agua y de fácil excreción. En insectos, la enzima UGT utiliza a la UDP-glucosa como el dador de azúcar, a diferencia de humanos que utiliza UDP-ácido glucurónico (Ahn et al., 2012). En insectos esta enzima se encuentra en cuerpo grasso, intestino y en la cabeza se la detectó en antena (He et al., 2017; Zhou et al., 2019).

La colocalización en antena de *Drosophila* de la enzima *cyp6a20*, UGTs y estererasas, refuerza la hipótesis de que la batería enzimática detoxificante sería importante en la degradación de odorantes, feromonas o químicos de defensa en insectos (Feyereisen, 1999; Wang & Anderson, 2009). Se ha sugerido que la CYP forma parte del catabolismo de feromonas sexuales en antena de mosca domestica (Feyereisen, 1999). Por otro lado, se ha demostrado que modificaciones funcionales del sistema periférico sensorial en animales modelo tanto invertebrados como vertebrados, tiene un impacto directo en la longevidad (Linford et al., 2011).

Los insectos tienen la capacidad de determinar pequeñas concentraciones sustancias a partir del uso de sus antenas, incluso pueden detectar pequeños cambios en la concentración de una determinada sustancia en el medio que lo rodea. A partir de esta premisa, Wang et al. (1999) sugiere que el insecto debe metabolizar rápidamente las sustancias en el interior de la antena, previniendo la continua estimulación del sistema olfatorio y al mismo tiempo permitir recaptación de sustancias del medio.

Consecuentemente con la hipótesis de Wang fue el hallazgo de la expresión diferencial de la OBP más abundante en antena, la OBP19d. En moscas macho con alto número de caídas supinas la expresión de OBP19d estuvo disminuida 2.216 veces en aquellos machos con muchas caídas supinas. La unión del volátil con la OBP es el primer evento para dar entrada del estímulo al interior de la antena del insecto y

desencadenar una respuesta. En oposición a la subexpresión de la OBP19d, todos los genes de la vía detoxificante estuvieron sobreexpresados en el grupo alto número de caídas supinas.

Arya et al. (2010) analizaron los perfiles de expresión de genes que están asociados a la expresión de distintas Obp (Obp8a, Obp18a, Obp19a, Obp19b, Obp19c y Obp19d) en machos de *D. melanogaster*. Informaron que junto con la Obp19d se expresa un patrón particular de genes al que llamó “nicho de expresión génica conjunta a Obp19d”. Hemos encontrados que muchos de esos genes están expresados diferencialmente en moscas con alto número de caídas supinas de *C. capitata*. La tabla 20 resume los genes que fueron informados en el trabajo de Arya y coincidieron con la lista de genes descubiertos en esta tesis. Además de los citocromos ya mencionados se encuentra el sNPF y un miembro de la superfamilia génica con dominio inmuno glubilina (Ig), llamado Plum, que pertenece a la misma superfamilia que el gen *Turtle* que será discutido luego.

Este resultado sugiere que este grupo de genes “detoxificante” podría estar metabolizando en señales volátiles pertenecientes al *lek*. Los descensos de esta obp19d podría deberse a el descenso en la captura de volátiles, quizás por saturación olfativa. La alta expresión de genes con rol en la diuresis podría también estar relacionado con la alta expresión de todos los genes relacionados con la vía “detoxificante” del insecto. Estos resultados indicarían que los machos con alto número de caídas espontaneas supinas podrían tener un aumento de la diuresis producto de la alta actividad detoxificante.

<i>D. melanogaster</i> Arya et al. (2010)		<i>C. capitata</i> Esta tesis		
Identificación gen	Nombre del gen	Identificación gen	Nombre del gen	Sobreexpresión en grupo A (4 o más caídas)
sNPF	Short neuropeptide F	LOC101463018	Short neuropetide F	+2.08
CG32843	Diuretic hormone 31	LOC101457563	Diuretic hormone class 2	+1.718
CG6180	Phosphatidylethanolamina-binding protein	LOC101452492	Phosphatidylethanolamin a-binding protein	+4.334
Aldh	Aldehyde dehydrogenase	LOC101461302	Aldehyde dehydrogenase mitocondrial	+2.215
CG30427	fatty-acyl-CoA reductase	LOC101460398	acyl-CoA dehydrogenase	+2.415
Treh	Trehalase (Alpha,alpha-trehalase activity)	LOC101461057	alpha,alpha-trehalose-phosphate synthase [UDP-forming]	+1.669
CG5157	Cytochrome b5	LOC101455730	cytochrome b5	+1.520
Cyp4p3	Cyp4p3	LOC101451754 LOC101459741 LOC101460097	cytochrome P450 4s3 cytochrome P450 4ad1 cytochrome P450 4e1	+1.600 +1.957 +2.107
Cyp12e1	Cyp12e1	CcCYP12B4	CcCYP12B4	+1.798
CG12030	UDP-galactose 4'-epimerase	LOC101458243	UDP-glucuronosyltransferase	+1.685
		LOC110118417	UDP-glucuronosyltransferase 2C1	+1.736
		LOC101460759	UDP-glucuronosyltransferase 2B19	+2.156
		LOC101450646	UDP-glucuronosyltransferase 2A2	+2.662
		LOC101451322	UDP-glucuronosyltransferase 2B7	+8.812
CG6490	Plum	LOC101457402	Turtle	+4.53 ^a (+2.24 ^b)
CG7180	Protein tyrosine phosphatase 36E	LOC101461343	tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 23	-1.504

Tabla 20. Lista de genes coincidentes entre el “nicho de expresión génica conjunta a *Obp19d*” determinado por Arya et al. (2010), con el patrón de expresión diferencial génica de machos con alto número de caídas supinas determinados en esta tesis. **a** Cuantificado solo en algunas muestra. **b** niveles cuantificados por PCR en tiempo real.

Expresión de genes de inmunidad innata

Fue sorprendente el hallazgo de diferencias significativas en genes implicados en la respuesta inmune innata, en nuestro paradigma experimental. En particular, el gen fundamental en inmunidad, *Persephone*, fue uno de los genes más subexpresado en animales con muchas caídas (-5.9 veces). Al mismo tiempo se determinó la sobreexpresión del gen *PEBP* con +4,3 veces en moscas con alto número de caídas supinas.

La respuesta inmune innata en insectos puede activarse por un inductor externo, sea hongo (Chamy et al., 2008), bacteria (Schachter et al., 2007) e incluso tras la picadura de avispas parasitoides en larvas de *Drosophila* (Schlenke et al., 2007); sin embargo nuestros resultados sugieren que también puede ocurrir inducción a partir del estado interno del insecto. Existen evidencias que sustentan nuestros resultados, donde se determinó que en un insecto bajo situación de estrés, se modifican los patrones de expresión de genes relacionados con inmunidad, y se activan cascadas señaléticas relacionadas con la respuesta inmune innata, aún sin la presencia de patógenos. Štětina et al. (2019) determinó en moscas de *D. melanogaster*, que el gen que codifica para la proteína *Sph* se sobreexpresa en moscas expuestas a estrés por frío. En abejas, se ha detectado que la *AccSp1* (*Apis cerana cerana serin-proteasa 1*), otra serin-proteasa que forma parte de la respuesta inmune de insectos, se activa ante diversos tipos de estrés como ser paraquat y shock térmico (Gao et al., 2019). Todos estos genes activan proteínas con dominio del tipo Rel, dominio de factor de transcripción tipo NF- κ B, activando la transcripción de péptidos antimicrobianos.

Neuropéptidos en moscas supinas

La tabla 21 enumera las distintas células nerviosas que expresan al sNPF. La diversidad de células tanto nerviosas como neuroendocrinas sugieren múltiples funciones, tanto en el sistema nervioso central, intestino y también como hormona circulante en hemolinfa (Nässel, 2018).

Células nerviosas que expresan sNPF	
Cuerpos pedunculados (<i>mushroom body</i>) <ul style="list-style-type: none"> • Células de Kenyon. • Células que inervan al lóbulo alfa. • Células que inervan al lóbulo beta. 	Johard et al. (2008) Nässel (2018)
Complejo central <ul style="list-style-type: none"> • Células que inervan al cuerpo en abanico (<i>Fan-Shaped Body</i>). 	Kahsai and Winther (2011)
Neuronas olfatorias /sensoriales presentes en: <ul style="list-style-type: none"> • Antena y lóbulos antenales. • Palpos 	Carlsson et al. (2010) Nässel et al. (2008)
Neuronas reloj (PDF+)	Nässel et al. (2008)
Células neurosecretoras en protocerebro	Johnston et al. (1995)
Neuronas próximas a la porción anterior del intestino	Veenstra (2009)
Interneuronas abdominales (<i>insuline-like</i>)	Nässel et al. (2008) Lee et al. (2008)

Tabla 21. Células nerviosas que expresan sNPF en insecto.

sNPF en metabolismo de moscas con caídas espontáneas supinas

Los machos de *C. capitata* que tuvieron un alto número de caídas supinas en el lek experimental (grupo A) tuvieron una sobreexpresión de 2.08 veces del gen sNPF. Este neuropéptido también regula la expresión de genes tipo insulina de insectos (*insuline like peptides*, DILPS), modulando los niveles de sustancias energéticas tales como trehalosa, glucógeno y lípidos. Broughton et al. (2005) demostró que altos niveles de sNPF en cerebro activa la expresión de genes DIPLS produciendo un descenso de los niveles de trehalosa en hemolinfa, y un descenso de los niveles de glucógeno y lípidos en músculo y cuerpo graso. Nuestros resultados mostraron que las moscas con altos niveles de expresión de sNPF (grupo A) tienen expresión diferencial de genes que codifican para enzimas involucradas en el metabolismo energético, principalmente aquellas relacionadas con el metabolismo y transporte de trehalosa (Tabla 22).

sNPF (+2.08)	facilitated trehalose transporter Tret1-2 homolog (-1,590)
	sugar transporter SWEET1 (-1,511)
	phosphoenolpyruvate carboxykinase [GTP] (-3,150)
	facilitated trehalose transporter Tret1 (+1,559)
	alpha,alpha-trehalose-phosphate synthase [UDP-forming] (+1,669)
	aldose 1-epimerase (+1,698)

Tabla 22. Grupo de genes involucrados en el metabolismo de trehalosa asociados al aumento de los niveles de sNPF en moscas con alto número de caídas supinas.

Los transportadores de trehalosa son esenciales en la homeostasis glía-neurona (Volkenhoff et al., 2015; Yasugi et al., 2017). La trehalosa es el azúcar circulante en hemolinfa de insectos y es la fuente inmediata de energía. En cerebro la trehalosa es metabolizada en glía, ingresando desde la hemolinfa al interior de la célula por acción

del transportador de trehalosa (Tret) (Volkenhoff et al., 2015). La trehalasa es la enzima que cliva la trehalosa dando como resultado 2 moléculas de glucosa, que luego de la glicólisis se produce alanina y lactato que luego son metabolizados por la neurona y son esenciales para la supervivencia de la neurona. Mutantes de *Drosophila* para estos transportadores tienen muerte neuronal, en particular los mutantes para el gen Tret 1-2 son mutantes con geotaxis reducida. Los organismos en general se adaptan a cambios en su entorno a través de la regulación hormonal y homeostasis metabólica, en especial el de azúcares (Elbein et al., 2003). Aquí nuestros resultados sugieren que los machos de *C. capitata* con muchos eventos supinos tienen una expresión diferencial de genes con especial función en el metabolismo de azúcares y en particular trehalosa. Hemos discutido anteriormente que la expresión de sNPF regula los niveles de trehalosa en hemolinfa, por lo tanto es de esperar que muchos genes pertenecientes a la vía metabólica de trehalosa se vieron afectados. Sin embargo, resulta interesante destacar la subexpresión del gen Tret 1-2 (-1.59), una explicación posible es que los bajos niveles de expresión de este transportador estén regulando la entrada de trehalosa a la glía y por lo tanto regulando el metabolismo del disacárido.

También determinamos la sobreexpresión de enzimas relacionadas con el metabolismo lipídico como ser acyl-CoA dehydrogenase (+1.73) y acyl-CoA synthetase (+2.41), ambas mitocondriales.

Nuestros resultados indican que las moscas con mayor número de caídas supinas dentro del *lek* tendrían un perfil energético diferente al de aquellos machos con pocas caídas supinas. Yuval et al. (1998) demostró que el éxito de los machos dentro del *lek* estaba determinado por el tamaño del macho como así también por el contenido de sustancias de reservas como lípidos y glucógeno, interpretando al “éxito” como la prevalencia dentro del *lek* y posterior cópula con la hembra. Trabajos en nuestro laboratorio demostraron la importancia de las sustancias de reservas lipídicas como así también de glucógeno y trehalosa en el estado de senescencia funcional del insecto (Bochicchio et al., 2017; Pujol-Lereis et al., 2012). En mi trabajo de tesis de licenciatura demostramos que moscas macho adultas estresadas desde una edad temprana (5 días de edad) tienen menores niveles de glucógeno en tejido y correlaciona con el descenso de la capacidad dispersiva y geotaxis (Bochicchio, 2012).

El neuropéptido sNPF también está asociado a la modulación del sistema inmune, activando la expresión de genes de la familia 4E-BP (Lee et al., 2008). Por otro lado, en la región promotora de los genes de esta familia se encuentran sitios canónicos de unión de proteína NFκB y región GATA, ambos sitios de necesarios para la inducción de expresión de genes de respuesta inmune. Tras infección bacteriana los niveles de 4E-BP aumentan (Bernal & Kimbrell, 2000). La familia 4E-BP es típicamente conocida como proteína de unión al factor de iniciación de la traducción eIF4E, la unión 4E-BP/eIF4E arresta la traducción de ARNm. Bernal observó que tras infección los niveles de expresión de este factor no se ven modificados, sugiriendo que la 4E-BP activaría la expresión de péptidos antimicrobianos por otra vía ajena a la regulada por el complejo 4E-BP/eIF4E.

La activación de genes con dominio NFκB está asociada no sólo con la respuesta inmune innata de insectos (a través de proteínas tipo Relish), sino también con la plasticidad neuronal y neurodegeneración, tanto en modelos vertebrados como en modelos invertebrados (Gutierrez et al., 2005; Heckscher et al., 2007; Meffert et al., 2003).

Metabolismo de neurotransmisores en moscas supinas

Las aminas biogénicas son importantes en la regulación de la agregación y peleas macho-macho en mosca *Drosophila* (Fernández & Kravitz, 2013; Kravitz & Fernandez, 2015). En particular el incremento de los niveles de dopamina en cerebro de machos de *Drosophila* intensifica la actividad de estos en el cortejo (Liu et al., 2008a). Nosotros hemos encontrado que los machos con alto número de caídas en posición supina dentro de un lek experimental tienen elevada la expresión de genes propios del metabolismo de dopamina. En particular encontramos que el transportador de dopamina (DAT) y la sepiapterine reductasa estuvieron sobreexpresadas en animales con alto número de caídas supinas en 2,67 y 2,53 veces respectivamente.

El metabolismo de dopamina y los circuitos neuronales dopaminérgicos han sido asociados a la actividad espontánea (Akasaka et al., 2010; Draper et al., 2007;

Miyatake et al., 2008). Hemos detectado que aquellos machos que tuvieron mayor número de caídas supinas en el lek experimental, fueron aquellos que mayoritariamente se comportaron como visitantes y fueron los que mayor distancia recorrieron.

Genes atáxicos

Se ha empleado largamente a la mosca *Drosophila melanogaster* como modelo de estudio de ataxias en humanos como ser: Síndrome de Angelman, ataxia espinocerebelar, Parkinson, ataxia Telangiectasia, ataxia de Friedreich, por citar las más experimentadas. Todas estas moscas atáxicas fueron **mutantes** que involucraron alteraciones genéticas en genes propios de la mosca y ortólogos de aquellos causantes de ataxias en humanos, o fueron moscas transgénicas que expresaban recombinaciones de variantes génicas de humanos. Si bien, como era de esperar, todas ellas manifestaban deficiencias locomotoras generales, hasta los fenotipos más sutiles de ataxias tuvieron un descenso en su capacidad geotáctica (Ajayi et al., 2012; Chen et al., 2014a; Monnier et al., 2018; Stagni et al., 2018; Wu et al., 2008).

En nuestros estudios hemos prestado especial atención a genes relacionados con ataxias. No encontramos diferencias significativas para los genes “atáxicos” ATM y parkin, entre machos con mayor o menor número de caídas supinas. Sin embargo, focalizamos nuestro interés en el gen turtle que está asociado a una ataxia similar al comportamiento normal de caída espontánea supina. Turtle es una proteína transmembrana que pertenece a la superfamilia de Inmunoglobulinas. Forma parte del remodelado y tendido axónico, como así también del modelado del árbol dendrítico a partir de la inhibición de unión de dendrita-dendrita (Chen et al., 2017; Long et al., 2009). Moscas *Drosophila* mutantes para este gen presentan problemas locomotores, principalmente no pueden darse vuelta y permanecen sobre su dorso (de ahí su nombre en alusión a una tortuga patas arriba) (Bodily et al., 2001).

Estudios pioneros del gen turtle en C.capitata

Por primera vez hemos secuenciado y cuantificado un fragmento específico del gen turtle en *C.capitata*. Este gen fue descubierto en *Drosophila* y detectado por nosotros en 2015 en el marco de esta tesis; recientemente ha sido detectado en el mosquito *Aedes* (2017), mosca *Lucilia c.* (2018), y tefrítidos como *Bactrocera* (2019), *Zeugodacus* (2019).

Hemos determinado la sobreexpresión del gen turtle en cabezas de moscas supinas, tanto por la técnica de PCR en tiempo real como por secuenciación masiva de genes. La sobreexpresión de este gen correlacionó con la sobreexpresión de genes neuronales, cuyos mutantes drosofilidos tienen locomoción defectuosa. Turtle es un gen que se expresa en el sistema nervioso central de los insectos y tiene función específica en la organización de la arquitectura de neuronas dopaminérgicas, tanto en el extendido específico del axón como en la arborización dendrítica (Bodily et al., 2001; Chen et al., 2017; Long et al., 2009; Sulkowski et al., 2011). Consistentemente con esta función fue el hallazgo de genes involucrados en los mismos procesos biológicos generales en el cerebro de insectos. En particular los genes sNPF, Dyrk1-minibrain, Formin-like, katanin-p60 y Ter-94, que están involucrados en tendido axónico y arborización dendrítica. Como así también fue consistente la expresión reportada de turtle en células dopaminérgicas junto con el DAT.

Con el objetivo de confirmar el fenotipo turtle en *Ceratitis capitata*, hemos bloqueado la expresión de este gen mediante el suministro de RNAi en la comida de larvas. En ensayos preliminares probamos con la técnica de microinyección en larvas y pupas, pero obtuvimos una mortalidad superior al 50% producto de la manipulación durante la microinyección. Sin embargo, con el suministro de RNAi en la comida de larvas se obtuvo una alta supervivencia de las moscas, resultando un 93.3% supervivencia en la pupariación y un 96,4% en la emergencia de adultos. La desventaja que presenta el suministro de RNAi en la comida es que no permite conocer la dosis de RNAi que cada larva ingirió, a diferencia de la microinyección, que permite conocer la concentración inyectada. Sin embargo, mediante el suministro de RNAi en la comida se

obtuvieron moscas macho con grandes dificultades motoras, como ser caminata desincronizada, imposibilidad del vuelo y por sobre todo la reiterada observación de eventos supinos espontáneos. Por lo tanto demostramos que el suministro de RNAi-turtle en la comida durante estadios larvales fue suficiente para desencadenar descoordinaciones motoras en adultos recién emergidos, similares al evento supino observado y cuantificado durante el lek experimental.

Los machos adultos tratados de 5 días de edad tuvieron una menor respuesta geotáctica respecto a los controles, incluso se han encontrado moscas tratadas con locomoción defectuosa severa que quedaron en posición supina por un tiempo mayor a los 4 segundos. La menor respuesta geotáctica en machos RNAi-turtle fue consistente con los resultados.

8. Conclusión y discusión general

Por primera vez recreamos un lek de *C.capitata* en el laboratorio. En él pudimos identificar todos los comportamientos que despliegan los machos en las agregaciones de lek en la naturaleza. Hemos demostrado que en el lek mínimo de 3 machos las moscas residentes interaccionan entre sí, siendo todas las interacciones siempre de a pares. Se observaron tres tipos de comportamientos individuales en el momento de producirse cada interacción: A – Residente “espectador”; B – Residente “defensor”; C - Residente “invasor”. Los machos alternaron estos comportamientos durante el lek, sin embargo determinamos que luego de los 6 días de observación cada macho tuvo un perfil predominante al que llamamos: perfil predominantemente visitante, predominantemente defensor y perfil mixto.

Identificamos y cuantificamos el peculiar evento de caída espontánea en posición supina. Esta caída en posición invertida sobre su dorso tuvo dos orígenes: como consecuencia de una interacción previa (supino inducido) o de forma espontánea y sin interacción previa (supino espontáneo). Resultó particularmente interesante la aparición de eventos de caídas espontáneas supinas ya que involucró la descoordinación de dos o más eventos: 1- la imposibilidad de sujeción de las patas a las paredes de la arena experimental, desencadenando el desprendimiento de la mosca y dar inicio a la caída; 2- la imposibilidad de corregir la orientación dorso-ventral del cuerpo en el transcurso de la caída hasta llegar a la base de la arena experimental, quedando patas arriba. Sabemos que los machos de *C.capitata* tienen la capacidad de enderezarse tras el desprendimiento de las paredes de la arena ya que hemos identificado caídas inducidas en posición prono, sin embargo sorpresivamente no detectamos caídas espontáneas en posición prono.

Determinamos que el sutil comportamiento de caídas espontáneas en posición supina correlacionó con el perfil predominante de cada uno de los tres machos durante el lek experimental, como así también con la distancia recorrida. En particular demostramos que los machos con un perfil predominantemente visitante tuvieron un mayor número de caídas espontáneas supinas, recorrieron una mayor distancia

durante el lek experimental y fueron los que tuvieron una longevidad más corta. Inverso fue lo que demostramos para machos con perfil predominantemente defensor, tuvieron un menor número de caídas espontáneas supinas, menor distancia recorrida y fueron más longevos. Resultó entonces que el peculiar evento supino espontáneo nos permitió, no sólo revelar el perfil predominante de cada macho durante el *lek*, sino que permitió determinar el grado de senescencia funcional de cada uno de ellos y lo que resultó aún más importante resultó ser un indicador de muerte temprana.

Fue entonces que con el evento supino espontáneo revelamos una situación natural donde por un lado observamos fenocopias de ataxias similares a las estudiadas en moscas mutantes de *Drosophila* y por otro lado la particularidad de ser un predictor de la longevidad de los machos de *C. capitata*.

Nos propusimos estudiar los niveles de expresión general de los ARNm en cabeza de machos. Dividimos los machos en dos grupos: A- muchas caídas espontáneas supinas (4 o más) y B- pocas caídas espontáneas supinas (0;1 o 2). Elegimos a la cabeza entera como tejido de estudio ya que mayoritariamente está compuesta por tejido nervioso (cerebro) y posee muchas de las estructuras sensoriales como ser antenas, palpos, ojos, ocelos, zetas. La cabeza en su conjunto es el tagma principal para ser estudiado en este particular evento de descoordinación, aunque no descartamos la participación de tórax en este tipo de descoordinación motoras. En ensayos preliminares observamos que moscas macho decapitadas, donde la herida fue cauterizada con una gota de cera, fueron capaces de sujetarse de las paredes de la arena experimental, se desplazaban caminando, saltaban e incluso volaron. Sin embargo, cuando con un rápido golpe del frasco forzamos que estos machos decapitados se posicionen sobre el fondo de la arena, observamos intentaron darse vuelta empleando patas y alas pero sin éxito. Si bien desde hace años se conoce que existen paquetes de neuronas que se proyectan desde la cabeza hacia la musculatura torácica (Strausfeld & Gronenberg, 1990), estudios recientes indican que los dípteros necesitan de la integración de señales visuales para las maniobras rotacionales en el eje antero-posterior (alabeo), no así para los otros dos movimientos “guiñada” y “cabeceo” que parecen ser independientes de señales visuales (Figura 67) (Bartussek & Lehmann, 2016; 2018; Liu et al., 2019). Este reciente descubrimiento fue consistente

con nuestras observaciones en moscas decapitadas y sostiene la relevancia de del estudio de la cabeza en el sutil evento de caída espontánea supina.

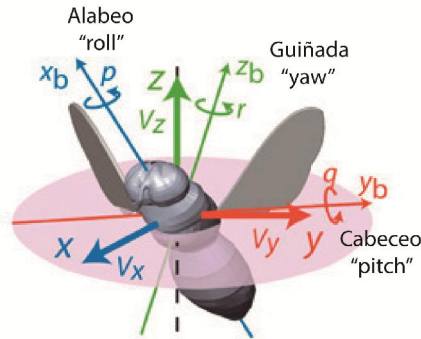


Figura 67. Ángulos de navegación de la mosca, definidos según el centro de masa del insecto (X,Y,Z). X_b : Eje de guiñada (yaw en inglés), Y_b cabeceo (pitch) y Z_b alabeo (roll).

Tras el análisis de la secuenciación masiva de mensajeros determinamos que sólo el 1.41% (196/13875) del total de mensajeros secuenciados tuvieron una expresión diferencial significativa. Sorpresivamente los grupos de genes con mayores niveles de expresión diferencial fueron el grupo de "genes detoxificantes y/o de estrés" con un 9.2% (18/196) y el grupo de "genes de importancia en el sistema nervioso" con un 8.2% (16/196).

Dentro del grupo de genes detoxificantes y/o de estrés encontramos que los 18 genes estaban sobreexpresados en cabeza de machos como muchas caídas supinas (Grupo A). Lo cual como se discutió en el capítulo 4 estaría relacionado a la gran actividad detoxificante de los machos del Grupo A por sobre los del Grupo B.

Encontramos que todos los genes dentro del grupo "importancia en el sistema nervioso" estaban sobreexpresados en machos con alto número de caídas supinas y está reportado que mutaciones en alguno de estos genes produce desordenes comportamentales en moscas mutantes de *D. melanogaster* (ver discusión capítulo 5). Dentro de este grupo de genes detectamos la sobreexpresión de un gen particular llamado turtle. Turtle es una proteína transmembrana que pertenece a la superfamilia Ig. Forma parte del remodelado y tendido axónico, como así también del modelado del árbol dendrítico a partir de la inhibición de unión de dendrita-dendrita (Chen et al.,

2017; Long et al., 2009). Al igual que en el gen Turtle, mutaciones en los genes *squeeze*, *ap-1*, *Formin like* y *Kat60* (que también estuvieron sobreexpresados en machos con muchas caídas) ocasionan la pérdida de estructura neuronal, dendrítica y proyección axónica en moscas mutantes *D. melanogaster*. Sin embargo la particularidad del gen *turtle* estuvo en que las moscas *Drosophilas* mutantes presentan problemas locomotores, principalmente no pueden darse vuelta y permanecen sobre su dorso (de ahí su nombre en alusión a una tortuga patas arriba) (Bodily et al., 2001).

Como fue de especial relevancia para nuestro estudio y por tratarse de un gen en ese momento desconocido en insectos que no fueran Drosófilidos y por tanto desconocido en *C. capitata* realizamos por primera vez la secuenciación parcial de este gen empleando la cepa "Mendoza" de *C. capitata*.

Para recrear el macho supino joven que detectamos durante el lek experimental, diseñamos un ARN de interferencia (ARNi) empleando nuestros datos de secuencia del gen *turtle*. El ARNi fue suministrado durante la etapa de larva en la comida y se obtuvieron machos adultos con grandes desordenes comportamentales entre ellos y el más notable fue el evento supino espontáneo. Estos machos tuvieron una respuesta geotáctica menor que los machos controles. En ensayos preliminares, que al momento de la entrega del manuscrito se están realizando, estos machos ARNi son menos activos en general durante el lek y tienen escasas interacciones macho-macho. Sorpresivamente, los primeros resultados mostraron que fueron más longevos que los machos controles. Esta mayor supervivencia que presentaron los machos RNAi podría deberse a que como ya se ha descrito en general en la literatura, los animales menos activos (actividad espontánea) son más longevos (Sohal, 2002; Sohal, 1986; Sohal & Orr, 2012).

Es bien conocido que la situación de agregación lleva a un aumento del estrés general, aumenta la tensión entre machos de *C. capitata* (Gaskin et al., 2002; Nash et al., 2018). Lo interesante en estas moscas es el manifiesto de un comportamiento de descoordinación locomotora. Esta descoordinación asociada no es menor ya que el

número de caídas espontáneas supinas nos permitió predecir la muerte temprana de los machos de *C.capitata*.

Tan solo las observaciones del número caídas espontáneas supinas nos permitió separar a la población de insectos jóvenes en dos. Donde vemos que los Machos con mayor número de eventos supinos espontáneos son los menos longevos, revelando dos perfiles de expresión diferentes (Figura 68).

Figura 68 (página siguiente). *Resumen de resultados donde se muestra que a partir del conteo de eventos supinos se puede dividir a la población de machos en dos, revelando dos perfiles comportamentales y de expresión génica diferencial. Entre paréntesis se nombran los genes con expresión diferencial mas destacados dentro de cada grupo.*

Resumen	<u>Mayor</u> número de eventos espontáneos supinos	<u>Menor</u> número de eventos espontáneos supinos
Comportamiento	Más visitantes	Menos visitantes
	Más activos	Menos activos
	<u>Menos longevos</u>	<u>Más longevos</u>
Perfil de expresión diferencial	Estrés-Sist. Detoxificante:	
	19↑ (Citocromos P450, UDP-glucuronosiltransferasas, esterasas)	0
	Sist. Nervioso:	
	14↑ (turtle, DAT, sNPF)	0
	Olfativo y gustatorio:	
	1↑	1↑ (Obp19d)
	Inmunidad:	
	2↑ (Persephone)	2↑
	Diuresis:	
	2↑ (hormona diurética)	0
	Metabolismo energético	
	3↑ (metabolismo trehalosa)	0

Firma del Doctorando.

Firma del Director de Tesis.

9. Material suplementario.

Tabla 1 suplementaria: *Tabla de genes con expresión diferencial. Genes con valores de P menores o iguales a 0,05 y con un Log2 de la tasa de cambio (LogFC) absoluto mayor a 0,4 fueron considerados como diferencialmente expresados. La tasa de cambio se expresó como A/B. A. machos con 4 o más caídas supinas y B. machos con 2 o menos caídas supinas. La relación 2^{FC} indica la cantidad de veces expresado que resultó el gen, si el resultado es negativo indica subexpresión en grupo A, si es positivo indica sobreexpresión en el grupo A. Los genes están ordenados según el orden creciente de expresión diferencial (2^{FC} , en módulo), divididos por las categorías: subexpresión y sobreexpresión.*

Genes subexpresados				
Símbolo	logFC	2^{FC}	pvalor	Información en NCBI
LOC101461343	-0,589	-1,504	0,035	PREDICTED: <i>Ceratitis capitata</i> tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 23
LOC101459804	-0,596	-1,511	0,049	PREDICTED: <i>Ceratitis capitata</i> sugar transporter SWEET1 (LOC101459804),
LOC101460672	-0,596	-1,512	0,041	PREDICTED: <i>Ceratitis capitata</i> uncharacterized LOC101460672
LOC101456509	-0,596	-1,512	0,05	PREDICTED: <i>Ceratitis capitata</i> triple functional domain protein (LOC101456509),
LOC101452463	-0,596	-1,512	0,038	PREDICTED: <i>Ceratitis capitata</i> platelet glycoprotein V (LOC101452434), mRNA
LOC101449312	-0,598	-1,514	0,019	PREDICTED: <i>Ceratitis capitata</i> uncharacterized LOC101449312
LOC105665098	-0,61	-1,526	0,04	PREDICTED: <i>Ceratitis capitata</i> uncharacterized LOC105665098
LOC101459045	-0,613	-1,529	0,04	PREDICTED: <i>Ceratitis capitata</i> calcium and integrin-binding protein 1 (LOC101459045),
LOC101460811	-0,616	-1,532	0,048	PREDICTED: <i>Ceratitis capitata</i> uncharacterized LOC101460811
LOC101463403	-0,616	-1,533	0,053	PREDICTED: <i>Ceratitis capitata</i> gonadal protein gdl (LOC101463403), mRNA
LOC101462189	-0,624	-1,541	0,047	PREDICTED: <i>Ceratitis capitata</i> beta-1,3-galactosyltransferase brn (LOC101462189),
LOC101454591	-0,629	-1,546	0,049	PREDICTED: <i>Ceratitis capitata</i> hypothetical protein (LOC101454591), mRNA
LOC101461547	-0,638	-1,556	0,041	PREDICTED: <i>Ceratitis capitata</i> uncharacterized protein ZK757.2

LOC101461694	-0,648	-1,567	0,022	PREDICTED: <i>Ceratitis capitata</i> GILT-like protein 1 (LOC101461694), mRNA
LOC101449049	-0,669	-1,59	0,025	PREDICTED: <i>Ceratitis capitata</i> facilitated trehalose transporter Tret1-2 homolog
LOC101456492	-0,683	-1,606	0,01	PREDICTED: <i>Ceratitis capitata</i> trimethylguanosine synthase
LOC101457261	-0,693	-1,616	0,026	PREDICTED: <i>Ceratitis capitata</i> rab GTPase-activating protein 1-like (LOC101457261),
LOC101456154	-0,696	-1,62	0,047	PREDICTED: <i>Ceratitis capitata</i> inactive ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase
LOC101461794	-0,718	-1,645	0,036	PREDICTED: <i>Ceratitis capitata</i> heat shock protein 23 (LOC101461794), mRNA
ND2	-0,72	-1,648	0,048	
LOC101452978	-0,748	-1,68	0,02	PREDICTED: <i>Ceratitis capitata</i> hypothetical protein (LOC101452978), mRNA
LOC101450946	-0,777	-1,713	0,011	PREDICTED: <i>Ceratitis capitata</i> uncharacterized LOC101450946
LOC101456499	-0,776	-1,713	0,032	PREDICTED: <i>Ceratitis capitata</i> probable salivary secreted peptide (LOC101456499),
LOC101452941	-0,786	-1,725	0,032	PREDICTED: <i>Ceratitis capitata</i> hypothetical protein (LOC101452941), mRNA
LOC110117837	-0,794	-1,734	0,051	PREDICTED: <i>Ceratitis capitata</i> putative uncharacterized protein DDB G0286901
LOC101460336	-0,842	-1,792	0,016	PREDICTED: <i>Ceratitis capitata</i> RNA exonuclease 1 homolog (LOC101460336),
LOC101458016	-0,861	-1,816	0,042	PREDICTED: <i>Ceratitis capitata</i> trypsin alpha-3 (LOC101458016), mRNA
LOC101450870	-0,878	-1,838	0,031	PREDICTED: <i>Ceratitis capitata</i> geminin (LOC101450870), mRNA
LOC111591720	-0,906	-1,873	0,003	PREDICTED: <i>Ceratitis capitata</i> C-type lectin 37Db-like (LOC111591720), mRNA
LOC110118444	-0,907	-1,875	0,042	PREDICTED: <i>Ceratitis capitata</i> uncharacterized LOC110118444
LOC101457649	-0,924	-1,898	0,052	PREDICTED: <i>Ceratitis capitata</i> hypothetical protein (LOC101457649), mRNA
LOC101448606	-0,938	-1,915	0,001	PREDICTED: <i>Ceratitis capitata</i> protein BUD31 homolog (LOC101448606), mRNA
LOC101456975	-0,953	-1,936	0,029	PREDICTED: <i>Ceratitis capitata</i> uncharacterized LOC101456975
LOC105664785	-0,961	-1,947	0,034	PREDICTED: <i>Ceratitis capitata</i> putative nuclease HARBI1 (LOC105664785), mRNA
LOC110118052	-0,987	-1,981	0,015	PREDICTED: <i>Ceratitis capitata</i> uncharacterized LOC110118052
LOC101459812	-1,006	-2,009	0,002	PREDICTED: <i>Ceratitis capitata</i> 60 kDa SS-A/Ro ribonucleoprotein (LOC101459812),
LOC101454705	-1,035	-2,049	0,03	PREDICTED: <i>Ceratitis capitata</i> protein rolling stone (LOC101454705), mRNA

LOC101454647	-1,046	-2,065	0,029	PREDICTED: <i>Ceratitis capitata</i> dnaJ homolog subfamily C member 7 homolog
LOC105664932	-1,121	-2,176	0,046	PREDICTED: <i>Ceratitis capitata</i> uncharacterized LOC105664932
LOC101448620	-1,148	-2,216	0,001	PREDICTED: <i>Ceratitis capitata</i> general odorant-binding protein 19d
LOC101454824	-1,158	-2,232	0,002	PREDICTED: <i>Ceratitis capitata</i> cuticle protein 64-like (LOC101454824), mRNA
LOC101461875	-1,196	-2,291	0,003	PREDICTED: <i>Ceratitis capitata</i> dolichol-phosphate mannosyltransferase subunit 3
LOC101455908	-1,283	-2,433	0,035	PREDICTED: <i>Ceratitis capitata</i> translation initiation factor IF-2 (LOC101455908),
LOC105665357	-1,377	-2,597	0,021	PREDICTED: <i>Ceratitis capitata</i> uncharacterized LOC105665357
LOC101458317	-1,401	-2,64	0,000 1	PREDICTED: <i>Ceratitis capitata</i> gamma-glutamylcyclotransferase-like
LOC101451219	-1,5	-2,828	0,011	PREDICTED: <i>Ceratitis capitata</i> fat-body protein 1 (LOC101451219), mRNA
LOC101452672	-1,579	-2,988	0,009	PREDICTED: <i>Ceratitis capitata</i> hypothetical protein (LOC101452560), mRNA
LOC101454202	-1,656	-3,152	0,001	PREDICTED: <i>Ceratitis capitata</i> larval serum protein 1 beta chain (LOC101454202),
LOC105665592	-2,105	-4,301	0,049	PREDICTED: <i>Ceratitis capitata</i> transmembrane protein 14 homolog
LOC101455735	-2,224	-4,673	0,016	PREDICTED: <i>Ceratitis capitata</i> male accessory gland serine protease inhibitor-
LOC101463086	-2,585	-5,998	0,007	PREDICTED: <i>Ceratitis capitata</i> serine protease persephone (LOC101463086),
LOC101450817	-2,725	-6,61	0,000 1	PREDICTED: <i>Ceratitis capitata</i> C-type lectin 37Db-like (LOC101450817), mRNA

Genes Sobreexpresados

symbol	logFC	2 [^] FC	pvalue	NCBI information
LOC111591516	0,593	1,508	0,051	PREDICTED: <i>Ceratitis capitata</i> sodium/potassium/calcium exchanger
LOC101455157	0,593	1,509	0,023	PREDICTED: <i>Ceratitis capitata</i> ring-infected erythrocyte surface antigen
LOC101456142	0,595	1,511	0,043	PREDICTED: <i>Ceratitis capitata</i> putative helicase mov-10-B.2 (LOC101456142),
LOC101455730	0,604	1,520	0,048	PREDICTED: <i>Ceratitis capitata</i> cytochrome b5-related protein (LOC101455730), mRNA
LOC101455485	0,604	1,520	0,029	PREDICTED: <i>Ceratitis capitata</i> uncharacterized protein KIAA0754
LOC101456329	0,606	1,522	0,033	PREDICTED: <i>Ceratitis capitata</i> uncharacterized LOC101456329 (LOC10145
LOC101453044	0,608	1,524	0,048	PREDICTED: <i>Ceratitis capitata</i> glutathione synthetase (LOC101453044), mRNA

LOC101451905	0,613	1,529	0,027	PREDICTED: <i>Ceratitis capitata</i> hypothetical protein (LOC101451905), mRNA
LOC101460283	0,613	1,530	0,044	PREDICTED: <i>Ceratitis capitata</i> major facilitator superfamily domain-containing
LOC101451659	0,616	1,532	0,021	PREDICTED: <i>Ceratitis capitata</i> probable cytochrome P450 6a14 (LOC101451659),
LOC111591790	0,618	1,535	0,024	PREDICTED: <i>Ceratitis capitata</i> glutathione synthetase-like (LOC111591790), mRNA
LOC101463406	0,618	1,535	0,020	PREDICTED: <i>Ceratitis capitata</i> NADP-dependent malic enzyme (LOC101463406),
LOC101460769	0,626	1,543	0,042	PREDICTED: <i>Ceratitis capitata</i> deformed epidermal autoregulatory factor 1
LOC101460566	0,630	1,548	0,035	PREDICTED: <i>Ceratitis capitata</i> protein TRC8 homolog (LOC101460566),mRNA
LOC101457137	0,634	1,552	0,025	PREDICTED: <i>Ceratitis capitata</i> serine hydroxymethyltransferase, cytosolic
LOC101448391	0,637	1,555	0,051	PREDICTED: <i>Ceratitis capitata</i> chitoooligosaccharidolytic beta-N-
LOC101449133	0,641	1,559	0,032	PREDICTED: <i>Ceratitis capitata</i> facilitated trehalose transporter Tret1
LOC101462007	0,643	1,562	0,051	PREDICTED: <i>Ceratitis capitata</i> endochitinase (LOC101462007), mRNA
LOC101452184	0,646	1,564	0,048	PREDICTED: <i>Ceratitis capitata</i> formin-like protein CG32138 (LOC101452184), mRNA
LOC101462148	0,646	1,564	0,038	PREDICTED: <i>Ceratitis capitata</i> cysteine protease ATG4B (LOC101462148), mRNA
LOC101458686	0,658	1,578	0,035	PREDICTED: <i>Ceratitis capitata</i> aspartate aminotransferase, mitochondrial
LOC101457730	0,675	1,596	0,049	PREDICTED: <i>Ceratitis capitata</i> 26S proteasome regulatory subunit 4
LOC101451754	0,678	1,600	0,019	PREDICTED: <i>Ceratitis capitata</i> probable cytochrome P450 4s3 (LOC101451754),
LOC101450753	0,678	1,600	0,043	PREDICTED: <i>Ceratitis capitata</i> sorbitol dehydrogenase (LOC101450753), mRNA
LOC101450357	0,684	1,607	0,045	PREDICTED: <i>Ceratitis capitata</i> probable peroxisomal acyl-coenzyme A oxidase 1
LOC101456276	0,685	1,608	0,023	PREDICTED: <i>Ceratitis capitata</i> lambda-crystallin homolog (LOC101456276), mRNA
LOC101456428	0,688	1,611	0,028	PREDICTED: <i>Ceratitis capitata</i> uncharacterized LOC101456428 (LOC10145
LOC101454728	0,693	1,616	0,049	PREDICTED: <i>Ceratitis capitata</i> filaggrin-2 (LOC101454728), mRNA
LOC101451003	0,698	1,622	0,039	PREDICTED: <i>Ceratitis capitata</i> serine-rich adhesin for platelets (LOC101451003),
LOC101448454	0,710	1,636	0,037	PREDICTED: <i>Ceratitis capitata</i> uncharacterized LOC101448454 (LOC10144
LOC105664503	0,712	1,638	0,012	PREDICTED: <i>Ceratitis capitata</i> uncharacterized LOC105664503 (LOC10566

LOC101462562	0,713	1,640	0,016	PREDICTED: <i>Ceratitis capitata</i> argininosuccinate synthase
LOC101452396	0,713	1,640	0,050	PREDICTED: <i>Ceratitis capitata</i> probable ATP-dependent RNA helicase DDX56
LOC101455946	0,715	1,641	0,030	PREDICTED: <i>Ceratitis capitata</i> SH3 domain-binding protein 5-like (LOC101455946),
LOC105665569	0,716	1,642	0,045	PREDICTED: <i>Ceratitis capitata</i> probable serine/threonine-protein kinase dyrk1
LOC101456102	0,721	1,648	0,008	PREDICTED: <i>Ceratitis capitata</i> D-3-phosphoglycerate dehydrogenase
LOC101458543	0,723	1,650	0,052	PREDICTED: <i>Ceratitis capitata</i> transitional endoplasmic reticulum ATPase TER94
LOC101452434	0,729	1,658	0,031	PREDICTED: <i>Ceratitis capitata</i> platelet glycoprotein V (LOC101452434), mRNA
LOC101451645	0,731	1,659	0,035	PREDICTED: <i>Ceratitis capitata</i> maltase 2 (LOC101451645), mRNA
LOC105665288	0,734	1,663	0,038	PREDICTED: <i>Ceratitis capitata</i> membrane metallo-endopeptidase-like 1
LOC101450781	0,736	1,666	0,041	PREDICTED: <i>Ceratitis capitata</i> alpha-glucosidase 2 (LOC101450781), mRNA
LOC101461057	0,739	1,669	0,016	PREDICTED: <i>Ceratitis capitata</i> alpha,alpha-trehalose-phosphate synthase [UDP-
LOC101450907	0,739	1,669	0,029	PREDICTED: <i>Ceratitis capitata</i> mannosyl-oligosaccharide alpha-1,2-mannosidase IA
LOC101448587	0,743	1,673	0,049	PREDICTED: <i>Ceratitis capitata</i> proton-coupled folate transporter (LOC101448587),
LOC101458243	0,753	1,685	0,012	PREDICTED: <i>Ceratitis capitata</i> UDP-glucuronosyltransferase (LOC101458243),
LOC101459769	0,758	1,691	0,042	PREDICTED: <i>Ceratitis capitata</i> T-cell activation inhibitor, mitochondrial
LOC101462478	0,763	1,697	0,013	PREDICTED: <i>Ceratitis capitata</i> NADPH:adrenodoxin oxidoreductase,
LOC101448967	0,764	1,698	0,049	PREDICTED: <i>Ceratitis capitata</i> aldose 1-epimerase (LOC101448967), mRNA
LOC101461302	0,770	1,705	0,009	PREDICTED: <i>Ceratitis capitata</i> aldehyde dehydrogenase, mitochondrial
LOC101453933	0,776	1,712	0,046	PREDICTED: <i>Ceratitis capitata</i> atypical kinase COQ8B, mitochondrial
LOC101457563	0,781	1,718	0,034	PREDICTED: <i>Ceratitis capitata</i> diuretic hormone class 2 (LOC101457563), mRNA
LOC101462302	0,782	1,719	0,004	PREDICTED: <i>Ceratitis capitata</i> uncharacterized LOC101462302 (LOC10146
LOC101450015	0,789	1,727	0,008	PREDICTED: <i>Ceratitis capitata</i> uncharacterized LOC101450015 (LOC10145
LOC101454695	0,790	1,729	0,043	PREDICTED: <i>Ceratitis capitata</i> uncharacterized LOC101454695 (LOC10145
LOC101458577	0,794	1,734	0,010	PREDICTED: <i>Ceratitis capitata</i> inositol-trisphosphate 3-kinase A (LOC101458577),

LOC101457674	0,795	1,735	0,021	PREDICTED: <i>Ceratitis capitata</i> pancreatic triacylglycerol lipase (LOC101457674),
LOC101460398	0,795	1,735	0,040	PREDICTED: <i>Ceratitis capitata</i> acyl-CoA dehydrogenase family member 9,
LOC110118417	0,796	1,736	0,027	PREDICTED: <i>Ceratitis capitata</i> UDP-glucuronosyltransferase 2C1
LOC101449794	0,805	1,747	0,049	PREDICTED: <i>Ceratitis capitata</i> ATP-dependent RNA helicase p62-like
LOC101454044	0,806	1,749	0,049	PREDICTED: <i>Ceratitis capitata</i> ATP-dependent RNA helicase p62-like
LOC101454866	0,807	1,749	0,027	PREDICTED: <i>Ceratitis capitata</i> zinc finger protein squeeze (LOC101454866), mRNA
LOC101451416	0,811	1,755	0,012	PREDICTED: <i>Ceratitis capitata</i> lysine--tRNA ligase (LOC101451416), mRNA
LOC105664916	0,816	1,761	0,040	PREDICTED: <i>Ceratitis capitata</i> uncharacterized LOC105664916 (LOC10566
LOC101458403	0,822	1,768	0,029	PREDICTED: <i>Ceratitis capitata</i> cryptochrome-1 (LOC101458403), mRNA
LOC110118043	0,823	1,769	0,046	PREDICTED: <i>Ceratitis capitata</i> glycine-rich RNA-binding protein 7-like (LOC110118043),
LOC101450104	0,827	1,774	0,041	PREDICTED: <i>Ceratitis capitata</i> cell wall protein IFF6 (LOC101450104), mRNA
LOC105664422	0,830	1,778	0,032	PREDICTED: <i>Ceratitis capitata</i> vacuole membrane protein 1 (LOC105664422),
LOC101463014	0,832	1,780	0,024	PREDICTED: <i>Ceratitis capitata</i> uncharacterized LOC101463014 (LOC10146
LOC101457898	0,834	1,783	0,035	PREDICTED: <i>Ceratitis capitata</i> uncharacterized LOC101457898 (LOC10145
CcCYP12B4	0,847	1,798	0,022	<i>Ceratitis capitata</i> cytochrome P450 12B4 (CcCYP12B4), mRNA
LOC101461941	0,847	1,798	0,011	PREDICTED: <i>Ceratitis capitata</i> uncharacterized LOC101461941 (LOC10146
LOC101462824	0,851	1,804	0,051	PREDICTED: <i>Ceratitis capitata</i> annulin (LOC101462824), mRNA
LOC101456934	0,855	1,809	0,005	PREDICTED: <i>Ceratitis capitata</i> retinol dehydrogenase 13 (LOC101456934), mRNA
LOC101460327	0,859	1,813	0,041	PREDICTED: <i>Ceratitis capitata</i> microtubule-associated protein tau (LOC101460327),
LOC101450109	0,859	1,814	0,021	PREDICTED: <i>Ceratitis capitata</i> zinc transporter 2 (LOC101450109), transcript
LOC101448695	0,877	1,837	0,002	PREDICTED: <i>Ceratitis capitata</i> uncharacterized LOC101448695 (LOC10144
LOC101448465	0,879	1,839	0,041	PREDICTED: <i>Ceratitis capitata</i> translation initiation factor IF-2, mitochondrial
LOC101460066	0,880	1,841	0,045	PREDICTED: <i>Ceratitis capitata</i> putative phospholipase B-like lamina ancestor
LOC101459831	0,882	1,843	0,029	PREDICTED: <i>Ceratitis capitata</i> multiple epidermal growth factor-like domains

LOC101452560	0,886	1,847	0,010	PREDICTED: <i>Ceratitis capitata</i> hypothetical protein (LOC101452560), mRNA
LOC101457186	0,897	1,863	0,023	PREDICTED: <i>Ceratitis capitata</i> uncharacterized LOC101457186 (LOC10145
LOC101448905	0,906	1,873	0,047	PREDICTED: <i>Ceratitis capitata</i> E3 ubiquitin-protein ligase RWD3 (LOC101448905),
LOC101452088	0,909	1,878	0,037	PREDICTED: <i>Ceratitis capitata</i> decaprenyl-diphosphate synthase subunit 1
LOC101449557	0,909	1,878	0,019	PREDICTED: <i>Ceratitis capitata</i> transducin beta-like protein 3 (LOC101449557), mRNA
LOC111591707	0,911	1,880	0,032	PREDICTED: <i>Ceratitis capitata</i> sodium/potassium/calcium exchanger
LOC101453905	0,920	1,893	0,048	PREDICTED: <i>Ceratitis capitata</i> uncharacterized LOC101453905 (LOC10145
LOC101450093	0,921	1,893	0,044	PREDICTED: <i>Ceratitis capitata</i> putative mediator of RNA polymerase II transcription
LOC101455831	0,929	1,905	0,007	PREDICTED: <i>Ceratitis capitata</i> ell-associated factor Eaf-like (LOC101455831), partial
LOC101448435	0,931	1,907	0,021	PREDICTED: <i>Ceratitis capitata</i> cathepsin L1 (LOC101448435), mRNA
LOC105664588	0,962	1,947	0,031	PREDICTED: <i>Ceratitis capitata</i> pleckstrin homology domain-containing family F
LOC101463239	0,967	1,954	0,024	PREDICTED: <i>Ceratitis capitata</i> glycine-rich protein DOT1 (LOC101463239), mRNA
LOC101459741	0,969	1,957	0,040	PREDICTED: <i>Ceratitis capitata</i> probable cytochrome P450 4ad1 (LOC101459741),
LOC101463373	0,970	1,959	0,031	PREDICTED: <i>Ceratitis capitata</i> uncharacterized LOC101463373 (LOC10146
LOC101448333	0,973	1,963	0,059	PREDICTED: <i>Ceratitis capitata</i> methionine--tRNA ligase, cytoplasmic (LOC101448333),
LOC101458135	0,975	1,966	0,027	PREDICTED: <i>Ceratitis capitata</i> uncharacterized LOC101458135 (LOC10145
LOC101450979	0,988	1,984	0,022	PREDICTED: <i>Ceratitis capitata</i> protein bowel (LOC101450979), mRNA
LOC101450811	0,995	1,993	0,029	PREDICTED: <i>Ceratitis capitata</i> another transcription unit protein (LOC101450811),
LOC101450844	0,995	1,993	0,035	PREDICTED: <i>Ceratitis capitata</i> purine nucleoside phosphorylase (LOC101450844),
LOC101453018	0,996	1,995	0,045	PREDICTED: <i>Ceratitis capitata</i> trifunctional purine biosynthetic protein adenosine-3
LOC101452369	0,997	1,996	0,022	PREDICTED: <i>Ceratitis capitata</i> PDF receptor (LOC101452369), transcript variant X2,
LOC101455081	0,998	1,997	0,007	PREDICTED: <i>Ceratitis capitata</i> zinc transporter 9 (LOC101455081), mRNA
LOC101455258	1,004	2,006	0,019	PREDICTED: <i>Ceratitis capitata</i> pickpocket protein 28 (LOC101455258), mRNA
LOC101455248	1,008	2,010	0,018	PREDICTED: <i>Ceratitis capitata</i> nuclear pore complex protein Nup93 (LOC101455248),

LOC101463198	1,010	2,014	0,003	PREDICTED: <i>Ceratitis capitata</i> uncharacterized LOC101463198 (LOC10146
LOC101454471	1,029	2,040	0,001	PREDICTED: <i>Ceratitis capitata</i> uncharacterized LOC101454471 (LOC10145
LOC101454324	1,052	2,073	0,038	PREDICTED: <i>Ceratitis capitata</i> protein phosphatase 1H (LOC101454324), mRNA
LOC101463018	1,056	2,080	0,021	PREDICTED: <i>Ceratitis capitata</i> short neuropeptide F (LOC101463018), mRNA
LOC101454042	1,067	2,095	0,026	PREDICTED: <i>Ceratitis capitata</i> glutamate receptor ionotropic, kainate 2
LOC101450745	1,075	2,107	0,014	PREDICTED: <i>Ceratitis capitata</i> cytochrome P450 6a9 (LOC101450745), mRNA
LOC101460097	1,081	2,116	0,021	PREDICTED: <i>Ceratitis capitata</i> probable cytochrome P450 4e1 (LOC101460097),
LOC101461665	1,086	2,123	0,049	PREDICTED: <i>Ceratitis capitata</i> transcription factor AP-1 (LOC101461665), mRNA
LOC111591623	1,087	2,124	0,445	PREDICTED: <i>Ceratitis capitata</i> small nucleolar RNA snR61/Z1/Z11
LOC101459507	1,095	2,136	0,022	PREDICTED: <i>Ceratitis capitata</i> probable ATP-dependent RNA helicase Dbp73D
LOC101461024	1,097	2,139	0,002	PREDICTED: <i>Ceratitis capitata</i> solute carrier family 41 member 1 (LOC101461024),
LOC101460759	1,109	2,156	0,010	PREDICTED: <i>Ceratitis capitata</i> UDP-glucuronosyltransferase 2B19
LOC101449424	1,119	2,172	0,037	PREDICTED: <i>Ceratitis capitata</i> neuropeptide-like 1 (LOC101449424), mRNA
LOC101459878	1,123	2,179	0,013	PREDICTED: <i>Ceratitis capitata</i> bifunctional methylenetetrahydrofolate
LOC101455245	1,127	2,184	0,017	PREDICTED: <i>Ceratitis capitata</i> RCC1 domain-containing protein 1 (LOC101455245),
LOC101459411	1,127	2,185	0,001	PREDICTED: <i>Ceratitis capitata</i> homocysteine S-methyltransferase (LOC101459411),
LOC101462935	1,130	2,188	0,004	PREDICTED: <i>Ceratitis capitata</i> esterase-5B (LOC101462935), mRNA
LOC101452912	1,147	2,214	0,001	PREDICTED: <i>Ceratitis capitata</i> hypothetical protein (LOC101452560), mRNA
LOC101450893	1,147	2,215	0,036	PREDICTED: <i>Ceratitis capitata</i> aldehyde dehydrogenase X, mitochondrial
LOC101457513	1,164	2,241	0,002	PREDICTED: <i>Ceratitis capitata</i> probable phosphoserine aminotransferase
LOC101449532	1,168	2,248	0,025	PREDICTED: <i>Ceratitis capitata</i> glycine-rich protein 5-like (LOC101449532), mRNA
LOC101457306	1,176	2,259	0,041	PREDICTED: <i>Ceratitis capitata</i> uncharacterized LOC101457306 (LOC10145
LOC101462136	1,176	2,259	0,010	PREDICTED: <i>Ceratitis capitata</i> esterase E4 (LOC101462136), mRNA
LOC101453904	1,210	2,314	0,039	PREDICTED: <i>Ceratitis capitata</i> uncharacterized LOC101453904 (LOC10145

LOC101452254	1,231	2,347	0,009	PREDICTED: <i>Ceratitis capitata</i> glutamate receptor ionotropic, kainate 2
LOC101457314	1,270	2,411	0,000 1	PREDICTED: <i>Ceratitis capitata</i> amidophosphoribosyltransferase
LOC101454584	1,272	2,415	0,011	PREDICTED: <i>Ceratitis capitata</i> acyl-CoA synthetase family member 2, mitochondrial
LOC101449393	1,302	2,465	0,009	PREDICTED: <i>Ceratitis capitata</i> cytochrome P450 6d3 (LOC101449393), mRNA
LOC101454959	1,333	2,518	0,021	PREDICTED: <i>Ceratitis capitata</i> pupal cuticle protein Edg-78E (LOC101454959), mRNA
LOC101462454	1,339	2,529	0,000	PREDICTED: <i>Ceratitis capitata</i> sepiapterin reductase (LOC101462454), mRNA
LOC105665197	1,363	2,573	0,014	PREDICTED: <i>Ceratitis capitata</i> uncharacterized LOC105665197 (LOC10566
LOC101449965	1,369	2,583	0,010	PREDICTED: <i>Ceratitis capitata</i> katanin p60 ATPase-containing subunit A1
LOC101461368	1,395	2,630	0,001	PREDICTED: <i>Ceratitis capitata</i> enhancer of split M1 protein (LOC101461368), mRNA
LOC101450646	1,412	2,662	0,000	PREDICTED: <i>Ceratitis capitata</i> UDP-glucuronosyltransferase 2A2
LOC101456969	1,417	2,670	0,002	PREDICTED: <i>Ceratitis capitata</i> sodium-dependent dopamine transporter
LOC101457303	1,650	3,139	0,023	PREDICTED: <i>Ceratitis capitata</i> cuticle protein 18.6 (LOC101457303), mRNA
LOC101458268	1,655	3,150	0,000 1	PREDICTED: <i>Ceratitis capitata</i> phosphoenolpyruvate carboxykinase [GTP]
LOC101452492	2,116	4,334	0,028	PREDICTED: <i>Ceratitis capitata</i> phosphatidylethanolamine-binding protein
LOC101461907	2,450	5,466	0,005	PREDICTED: <i>Ceratitis capitata</i> putative H/ACA ribonucleoprotein complex subunit
LOC101453843	2,730	6,634	0,001	PREDICTED: <i>Ceratitis capitata</i> zinc carboxypeptidase (LOC101453843), mRNA
LOC101451322	3,140	8,812	0,003	PREDICTED: <i>Ceratitis capitata</i> UDP-glucuronosyltransferase 2B7

Tabla suplementaria 2: Ontología genética de los datos recolectados en la base de datos Uniprot para los genes con expresión diferencial. Se muestran los resultados para las categorías de posible “función molecular” y “proceso biológico”.

Los genes están ordenados según el orden creciente de expresión diferencial (2^{FC} , en módulo), divididos por las categorías: subexpresión y sobreexpresión.

Ontología genética (GO)			
Genes subexpresados			
Símbolo	Nombre	Función molecular	Proceso biológico
LOC101461343	Tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 23	protein tyrosine phosphatase activity	cilium assembly; regulation of cell migration; ubiquitin-dependent protein catabolic process via the multivesicular body sorting pathway
LOC101459804	Sugar transporter SWEET1	sugar transmembrane transporter activity	carbohydrate transport; salivary gland development.
LOC101452463	Platelet glycoprotein V	ND	Axonogenesis, cell adhesion
LOC101456509	triple functional domain protein	ATP binding	regulation of Rho protein signal transduction
LOC101460672	uncharacterized	ND	ND
LOC101449312	uncharacterized	ND	ND
LOC105665098	uncharacterized	ND	ND
LOC101459045	Calcium and integrin-binding protein 1	calcium-dependent protein kinase inhibitor activity; calcium ion binding.	apoptotic process; cell adhesion; cellular response to DNA damage stimulus.
LOC101460811	uncharacterized	ND	ND
LOC101463403	gonadal protein gdl	ND	ND

LOC101462189	Beta-1,3-galactosyltransferase brn	acetylglucosaminyltransferase activity; beta-1,4-mannosylglycolipid beta-1,3-N-acetylglucosaminyltransferase activity	border follicle cell migration; germarium-derived egg chamber formation; glycosphingolipid biosynthetic process; maintenance of polarity of follicular epithelium; morphogenesis of follicular
LOC101454591	uncharacterized	ND	ND
LOC101461547	uncharacterized	ND	ND
LOC101461694	GILT-like protein 1	disulfide oxidoreductase activity	immune system process; oxidation-reduction process; positive regulation of defense response to bacterium
LOC101449049	Facilitated trehalose transporter Tret1-2 homolog	carbohydrate:proton symporter activity; glucose transmembrane transporter activity	glucose import
LOC101456492	trimethylguanosine synthase	methyltransferase activity	7-methylguanosine RNA capping; RNA methylation.
LOC101457261	rab GTPase-activating protein 1-like	GTPase activator activity	cell cycle
LOC101456154	inactive ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase	ND	ND
LOC101461794	Heat shock protein 23	Actin binding; unfolded protein binding.	chaperone-mediated protein folding; cold acclimation; protein refolding; response to heat; response to hypoxia.
ND2	NADH-ubiquinone oxidoreductase chain 2	NADH dehydrogenase (ubiquinone) activity	mitochondrial electron transport, NADH to ubiquinone
LOC101452978	hypothetical protein	ND	ND
LOC101456499	salivary secreted peptide	ND	ND
LOC101450946	uncharacterized	ND	ND
LOC101452941	hypothetical protein	ND	ND
LOC110117837	putative uncharacterized protein ddb	ND	ND

LOC101460336	RNA exonuclease 1 homolog	exonuclease activity; nucleic acid binding	
LOC101458016	trypsin alpha-3	serine-type endopeptidase activity	ND
LOC101450870	geminin	ND	Eggshell chorion gene amplification; endomitotic cell cycle; negative regulation of DNA replication; negative regulation of epidermal growth factor receptor signaling pathway; regulation of syncytial
LOC111591720	C-type lectin 37Db-like	galactose binding	calcium-dependent cell-cell adhesion via plasma membrane cell adhesion molecules
LOC110118444	uncharacterized	ND	ND
LOC101457649	hypothetical protein	ND	ND
LOC101448606	protein BUD31 homolog	Ligand-dependent nuclear receptor transcription coactivator activity; nuclear hormone receptor binding.	mRNA splicing, via spliceosome; positive regulation of androgen receptor activity.
LOC101456975	uncharacterized	ND	ND
LOC105664785	putative nuclease HARBI1	ND	ND
LOC110118052	uncharacterized	ND	ND
LOC101459812	60 kDa SS-A/Ro ribonucleoprotein	RNA binding	ND
LOC101454705	protein rolling stone	ND	myoblast fusion
LOC101454647	dnaJ homolog subfamily C member 7 homolog	heat shock protein binding	chaperone cofactor-dependent protein refolding
LOC105664932	uncharacterized	ND	ND
LOC101448620	general odorant-binding protein 19d	odorant binding; pheromone binding.	sensory perception of chemical stimulus

LOC101454824	cuticle protein 64-like	ND	ND
LOC101461875	dolichol-phosphate mannosyltransferase subunit 3	transferase activity, transferring glycosyl groups	protein glycosylation
LOC101455908	translation initiation factor IF-2	translation initiation factor activity	Axon midline choice point recognition; formation of translation preinitiation complex; response to endoplasmic reticulum stress; translational initiation
LOC105665357	uncharacterized	ND	ND
LOC101458317	gamma-glutamylcyclotransferase- like	transferase activity	ND
LOC101451219	fat-body protein 1	ND	ND
LOC101452672	uncharacterized	ND	ND
LOC101454202	larval serum protein 1 beta chain	nutrient reservoir activity	ND
LOC105665592	transmembrane protein 14 homolog	ND	ND
LOC101455735	male accessory gland serine protease inhibitor-like	peptidase inhibitor activity	multicellular organism reproduction
LOC101463086	serine protease persephone	Serine-type endopeptidase activity.	Defense response; defense response to fungus; innate immune response.
LOC101450817	C-type lectin 37Db-like	Galactose binding; metal ion binding.	Calcium-dependent cell-cell adhesion via plasma. membrane.cell adhesion molecules
Genes Sobreexpresados			
Símbolo	Nombre	Función molecular	Proceso biológico
LOC111591516	Sodium/potassium/calcium exchanger Nckx30C	calcium channel activity; calcium ion binding	calcium ion transmembrane transport; calcium ion transport; compound eye development.

LOC101455157	ring-infected erythrocyte surface antigen	ND	ND
LOC101456142	Putative helicase mov-10-B.2	helicase activity	ND
LOC101455730	Cytochrome b5-related protein	oxidoreductase activity; heme binding	lipid metabolic process
LOC101455485	uncharacterized	ND	ND
LOC101456329	uncharacterized	ND	ND
LOC101453044	Glutathione synthetase	glutathione binding; glutathione synthase activity	detoxification of arsenic-containing substance; response to ethanol.
LOC101451905	uncharacterized	ND	ND
LOC101460283	major facilitator superfamily domain-containing protein 6	ND	ND
LOC101451659	Probable cytochrome P450 6a14	oxidoreductase activity	ND
LOC111591790	Glutathione synthetase-like	glutathione synthase activity; metal ion binding.	ND
LOC101463406	NADP-dependent malic enzyme	malate dehydrogenase (decarboxylating) (NAD+) activity; NAD binding.	ND
LOC101460769	Deformed epidermal autoregulatory factor 1	DNA binding transcription factor activity; sequence-specific DNA binding; zinc ion binding	embryo development ending in birth or egg hatching; positive regulation of transcription, DNA-templated; regulation of immune response; regulation of transcription by RNA polymerase II.
LOC101460566	Protein TRC8 homolog	ubiquitin-protein transferase activity; zinc ion binding	protein ubiquitination
LOC101457137	Serine hydroxymethyltransferase, cytosolic	glycine hydroxymethyltransferase activity; protein homodimerization activity; pyridoxal phosphate binding;	folic acid metabolic process; glycine metabolic process; L-serine catabolic process; L-serine metabolic process; protein homotetramerization; protein tetramerization; purine nucleobase ;
LOC101448391	Chitooligosaccharidolytic beta-N-acetylglucosaminidase	beta-N-acetylhexosaminidase activity	carbohydrate metabolic process

LOC101449133	acilitated trehalose transporter Tret1	trehalose transmembrane transporter activity	trehalose transport
LOC101462007	Endochitinase	chitin binding; hydrolase activity, hydrolyzing O-glycosyl compounds	carbohydrate metabolic process; chitin metabolic process.
LOC101452184	Formin-like protein CG32138	actin binding	axon extension; mushroom body development; ommatidial rotation.
LOC101462148	Cysteine protease	cysteine-type endopeptidase activity	autophagy
LOC101458686	Aspartate aminotransferase	L-aspartate:2-oxoglutarate aminotransferase activity	aspartate metabolic process; glutamate biosynthetic process; neurotransmitter receptor metabolic process; synapse assembly.
LOC101457730	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 4	polyubiquitin modification-dependent protein binding; ubiquitin conjugating enzyme binding; zinc ion binding.	mitotic sister chromatid segregation; proteasome-mediated ubiquitin-dependent protein catabolic process
LOC101451754	Probable cytochrome P450 4s3	monooxygenase activity	ND
LOC101450753	sorbitol dehydrogenase	oxidoreductase activity; zinc ion binding	ND
LOC101450357	probable peroxisomal acyl-coenzyme A oxidase 1	acyl-CoA oxidase activity	fatty acid beta-oxidation
LOC101456276	lambda-crystallin homolog	3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase activity; NAD+ binding.	fatty acid metabolic process
LOC101456428	uncharacterized	ND	ND
LOC101454728	Filaggrin-2	calcium ion binding	ND
LOC101451003	serine-rich adhesin for platelets-like	polysaccharide binding; scavenger receptor activity.	immune response
LOC101448454	uncharacterized	ND	ND
LOC105664503	uncharacterized	ND	ND

LOC101462562	Argininosuccinate synthase	argininosuccinate synthase activity; ATP binding.	arginine biosynthetic process; argininosuccinate metabolic process; urea cycle.
LOC101452396	probable ATP-dependent RNA helicase DDX56	ATP binding; helicase activity; nucleic acid binding.	ND
LOC101455946	SH3 domain-binding protein 5-like protein	ND	intracellular signal transduction
LOC105665569	probable serine/threonine-protein kinase dyrk1	ND	ND
LOC101456102	D-3-phosphoglycerate dehydrogenase-like	NAD binding; phosphoglycerate dehydrogenase activity.	L-serine biosynthetic process; phosphatidylinositol phosphorylation.
LOC101458543	Transitional endoplasmic reticulum ATPase TER94	ATP binding; hydrolase activity.	autophagosome maturation; cellular response to virus; dendrite morphogenesis; endoplasmic reticulum membrane fusion; endoplasmic reticulum organization; Golgi organization; larval
LOC101452434	platelet glycoprotein V	ND	ND
LOC101451645	Maltase 2	maltose alpha-glucosidase activity	ND
LOC105665288	membrane metallo-endopeptidase-like 1	ND	ND
LOC101450781	alpha-glucosidase 2	ND (possible maltase)	ND
LOC101461057	alpha,alpha-trehalose-phosphate synthase [UDP-forming]	catalytic activity	trehalose biosynthetic process
LOC101450907	mannosyl-oligosaccharide alpha-1,2-mannosidase IA	calcium ion binding	mannosyl-oligosaccharide 1,2-alpha-mannosidase activity
LOC101448587	Proton-coupled folate transporter	transporter activity	transmembrane transport
LOC101458243	UDP-glucuronosyltransferase	glucuronosyltransferase activity; UDP-glycosyltransferase activity	UDP-glucose metabolic process
LOC101459769	T-cell activation inhibitor, mitochondrial	ND	ND

LOC101462478	NADPH:adrenodoxin oxidoreductase, mitochondrial	NADPH-adrenodoxin reductase activity	Metamorphosis; molting cycle, chitin-based cuticle; olfactory behavior; pupariation; steroid biosynthetic process
LOC101448967	aldose 1-epimerase	aldose 1-epimerase activity; carbohydrate binding	galactose catabolic process via UDP-galactose; glucose metabolic process.
LOC101461302	Aldehyde dehydrogenase	acetaldehyde dehydrogenase (acetylating) activity; aldehyde dehydrogenase (NAD) activity	acetaldehyde metabolic process; negative regulation of neuron death; pyruvate metabolic process; response to ethanol.
LOC101453933	atypical kinase COQ8B, mitochondrial	ND	ND
LOC101457563	Diuretic hormone class 2	Diuretic hormone class 2	body fluid secretion
LOC101462302	uncharacterized	ND	ND
LOC101450015	uncharacterized	ND	ND
LOC101454695	uncharacterized	ND	ND
LOC101458577	inositol-trisphosphate 3-kinase A	ND	ND
LOC101457674	pancreatic triacylglycerol lipase	carboxylic ester hydrolase activity	lipid metabolic process
LOC101460398	acyl-CoA dehydrogenase family member 9, mitochondrial	flavin adenine dinucleotide binding; oxidoreductase activity, acting on the CH-CH group of donors	ND
LOC110118417	UDP-glucuronosyltransferase 2C1	transferase activity, transferring hexosyl groups	metabolic process
LOC101449794	ATP-dependent RNA helicase p62-like	ATP binding; helicase activity; RNA binding	ND
LOC101454044	ATP-dependent RNA helicase p62-like	ATP binding; helicase activity; RNA binding	ND
LOC101454866	Zinc finger protein squeeze	nucleic acid binding	dendrite guidance; neuroblast development; neuron development; oogenesis.

LOC101451416	lysine--tRNA ligase	lysine-tRNA ligase activity	lysyl-tRNA aminoacylation
LOC105664916	uncharacterized	ND	ND
LOC101458403	cryptochrome-1	blue light photoreceptor activity; flavin adenine dinucleotide binding.	negative regulation of transcription, DNA-templated; protein import into nucleus, translocation; regulation of circadian rhythm.
LOC110118043	glycine-rich RNA-binding protein 7-like	ND	ND
LOC101450104	cell wall protein IFF6	chitin binding	chitin metabolic process
LOC105664422	vacuole membrane protein 1	ND	ND
LOC101463014	uncharacterized	ND	ND
LOC101457898	uncharacterized	ND	ND
CcCYP12B4	cytochrome P450 12B4	heme binding; iron ion binding; monooxygenase activity; oxidoreductase activity, acting on paired donors, with incorporation or reduction of molecular oxygen	ND
LOC101461941	uncharacterized	ND	ND
LOC101462824	annulin	metal ion binding; protein-glutamine gamma-glutamyltransferase activity.	peptide cross-linking
LOC101456934	retinol dehydrogenase 13	ND	ND
LOC101460327	Microtubule-associated protein	microtubule binding	microtubule-based process; microtubule cytoskeleton organization; negative regulation of neuron death; rhabdomyere morphogenesis.
LOC101450109	zinc transporter 2	ND	ND
LOC101448695	uncharacterized	ND	ND

LOC101448465	translation initiation factor IF-2, mitochondrial	GTPase activity; translation initiation factor activity, tRNA binding.	mitochondrial translation; translational initiation.
LOC101460066	putative phospholipase B-like lamina ancestor	hydrolase activity	dorsal appendage formation; imaginal disc development
LOC101459831	multiple epidermal growth factor-like domains protein 11	ND	ND
LOC101452560	uncharacterized	ND	ND
LOC101457186	uncharacterized	ND	ND
LOC101448905	E3 ubiquitin-protein ligase RFW3	ubiquitin-protein transferase activity	interstrand cross-link repair
LOC101452088	decaprenyl-diphosphate synthase subunit 1	transferase activity	isoprenoid biosynthetic process
LOC101449557	transducin beta-like protein 3	ND	rRNA processing
LOC111591707	sodium/potassium/calcium exchanger Nckx30C-like	calcium, potassium:sodium antiporter activity	calcium ion transmembrane transport; calcium ion transport; compound eye development
LOC101453905	uncharacterized	ND	ND
LOC101450093	putative mediator of RNA polymerase II transcription subunit 26	cAMP response element binding protein binding	positive regulation of CREB transcription factor activity; protein homotetramerization
LOC101455831	ell-associated factor Eaf-like	ND	ND
LOC101448435	cathepsin L1	cysteine-type peptidase activity	ND
LOC105664588	pleckstrin homology domain-containing family F member 1 homolog	phosphatidylinositol binding	Endocytosis; endosome organization; endosome to lysosome transport
LOC101463239	glycine-rich protein DOT1	ND	ND

LOC101459741	cytochrome P450 4ad1	heme binding; iron ion binding; oxidoreductase activity, acting on paired donors, with incorporation or reduction of molecular oxygen.	ND
LOC101463373	uncharacterized	ND	ND
LOC101448333	methionine--tRNA ligase, cytoplasmic	methionine-tRNA ligase activity	methionyl-tRNA aminoacylation
LOC101458135	uncharacterized	ND	ND
LOC101450979	bowel	RNA polymerase II transcription factor activity, sequence-specific DNA binding	hindgut morphogenesis; imaginal disc-derived leg joint morphogenesis; wing disc development; positive regulation of transcription, DNA-templated; positive regulation of transcription by
LOC101450811	uncharacterized	ND	ND
LOC101450844	purine nucleoside phosphorylase	S-methyl-5-thioadenosine phosphorylase activity	purine ribonucleoside salvage
LOC101453018	trifunctional purine biosynthetic protein adenosine-3	phosphoribosylamine-glycine ligase activity; phosphoribosylformylglycinamide cyclo-ligase activity; phosphoribosylglycinamide formyltransferase activity	purine nucleobase biosynthetic process
LOC101452369	PDF receptor	calcitonin receptor activity	adenylate cyclase-activating G-protein coupled receptor signaling pathway; circadian behavior; circadian rhythm; circadian sleep/wake cycle; circadian temperature homeostasis; copper ion homeostasis;
LOC101455081	zinc transporter 9	ND	ND
LOC101455258	pickpocket protein 28	sodium channel activity	cellular response to water stimulus; drinking behavior; response to water; sodium ion transport.
LOC101455248	nuclear pore complex protein Nup93	structural constituent of nuclear pore	nuclear pore organization; protein import into nucleus; protein localization to nuclear inner membrane; regulation of nucleus size.
LOC101463198	uncharacterized	ND	ND
LOC101454471	uncharacterized	ND	ND
LOC101454324	phosphatase 1H	protein serine/threonine phosphatase activity	ND

LOC101463018	short neuropeptide F	neuropeptide F receptor binding	circadian behavior; circadian rhythm; G-protein coupled receptor signaling pathway; larval feeding behavior; larval locomotory behavior; locomotor rhythm; male courtship behavior; neuropeptide
LOC101454042	glutamate receptor ionotropic, kainate 2	extracellularly glutamate-gated ion channel activity; ionotropic glutamate receptor activity.	ND
LOC101450745 *	Cytochrome P450 6a9	electron transfer activity; heme binding; iron ion binding; oxidoreductase activity, acting on paired donors, with incorporation or reduction of molecular oxygen	ND
LOC101460097	Cytochrome P450 4e1	heme binding; iron ion binding; oxidoreductase activity, acting on paired donors, with incorporation or reduction of molecular oxygen.	ND
LOC101461665	transcription factor AP-1	RNA polymerase II transcription factor activity, sequence-specific DNA binding	dorsal appendage formation; dorsal closure; establishment of planar polarity; imaginal disc fusion, thorax closure; JNK cascade; MAPK cascade; micropyle formation; multicellular organism aging; negative regulation of antimicrobial humoral response; positive regulation of heart contraction; R3/R4 cell fate commitment; synaptic growth at neuromuscular junction; wound healing
LOC111591623	small nucleolar RNA snR61/Z1/Z11	ND	ND
LOC101459507	Probable ATP-dependent RNA helicase Dbp73D	ATP-dependent RNA helicase activity	RNA secondary structure unwinding
LOC101461024	solute carrier family 41 member 1	cation transmembrane transporter activity	ND
LOC101460759	UDP-glucuronosyltransferase 2B19	UDP-glycosyltransferase activity	UDP-glucose metabolic process
LOC101449424	neuropeptide-like 1	neuropeptide hormone activity; receptor ligand activity.	positive regulation of cGMP-mediated signaling
LOC101459878	bifunctional methylenetetrahydrofolate	magnesium ion binding; methenyltetrahydrofolate cyclohydrolase activity; methylenetetrahydrofolate dehydrogenase (NAD+) activity;	10-formyltetrahydrofolate metabolic process; carbohydrate metabolic process.
LOC101455245	RCC1 domain-containing protein 1	ND	ND
LOC101459411	homocysteine S-methyltransferase	betaine-homocysteine S-methyltransferase activity; zinc ion binding.	methionine biosynthetic process
LOC101462935	esterase-5B	carboxylic ester hydrolase activity	ND

LOC101452912	uncharacterized	ND	ND
LOC101450893	aldehyde dehydrogenase X, mitochondrial	oxidoreductase activity, acting on the aldehyde or oxo group of donors, NAD or NADP as acceptor	ND
LOC101457513	phosphoserine aminotransferase	O-phospho-L-serine:2-oxoglutarate aminotransferase activity	L-serine biosynthetic process
LOC101449532	glycine-rich protein 5-like	ND	ND
LOC101457306	uncharacterized	ND	ND
LOC101462136	esterase E4	ND	ND
LOC101453904	uncharacterized	ND	ND
LOC101452254	glutamate receptor ionotropic, kainate 2	extracellularly glutamate-gated ion channel activity; ionotropic glutamate receptor activity	ND
LOC101457314	amidophosphoribosyltransferase	amidophosphoribosyltransferase activity	determination of adult lifespan; embryonic cleavage; oogenesis; purine nucleobase biosynthetic process.
LOC101454584	acyl-CoA synthetase family member 2, mitochondrial	catalytic activity	metabolic process
LOC101449393	cytochrome P450 6d3	heme binding; iron ion binding; oxidoreductase activity, acting on paired donors, with incorporation or reduction of molecular oxygen	ND
LOC101454959	Pupal cuticle protein Edg-78E	structural constituent of chitin-based larval cuticle; structural constituent of pupal chitin-based cuticle	chitin-based cuticle development
LOC101462454	sepiapterin reductase	sepiapterin reductase activity	tetrahydrobiopterin biosynthetic process
LOC105665197	uncharacterized	ND	ND
LOC101449965	katanin p60 ATPase-containing subunit A1	microtubule binding; microtubule-severing ATPase activity; myosin binding	cytoplasmic microtubule organization; dendrite development; microtubule-based process; microtubule depolymerization; microtubule severing; mitotic sister chromatid segregation; negative

LOC101461368	enhancer of split M1 protein	serine-type endopeptidase inhibitor activity	regulation of proteolysis
LOC101450646	UDP-glucuronosyltransferase 2A2	glucuronosyltransferase activity	cellular glucuronidation
LOC101456969	sodium-dependent dopamine transporter	dopamine transmembrane transporter activity	adult locomotory behavior; circadian sleep/wake cycle; dopamine transport; regulation of presynaptic cytosolic calcium ion concentration; response to odorant; sleep.
LOC101457303	cuticle protein 18.6	structural constituent of cuticle	ND
LOC101458268	Phosphoenolpyruvate carboxykinase [GTP]	phosphoenolpyruvate carboxykinase (GTP) activity	gluconeogenesis
LOC101452492	phosphatidylethanolamine-binding protein	defense response to Gram-negative bacterium; defense response to Gram-positive bacterium; regulation of antimicrobial humoral response	ND
LOC101461907	putative H/ACA ribonucleoprotein complex subunit 1-like protein 1	ND	ND
LOC101453843	zinc carboxypeptidase	metallocarboxypeptidase activity	ND
LOC101451322 *	UDP-glucuronosyltransferase 2B7	glucuronosyltransferase activity	metabolic process

Anexo teórico

Compuestos orgánicos volátiles (COV) de la Mosca del mediterráneo

Los compuestos químicos volátiles producidos por la mosca *C. capitata* que participan de la comunicación entre machos y hembras y entre miembros del mismo sexo son numerosos. En *C. capitata* se han identificado 56 compuestos (de un total de 69) en los machos sexualmente maduros criados en el laboratorio. Estos compuestos estaban contenidos en hexenoatos y hexanoatos de metilo y etilo, ésteres C4-C6 y / o acetatos, etil y metiloctenoatos, monoterpénos, sesquiterpénos (*faneseno*), acetatos C2-C5, alcoholes y cetonas (Jang, 1995).

Flath et al. (1993) estudiaron el efecto de la edad de la mosca y la hora del día sobre las emisiones de compuestos volátiles del macho de *C. capitata*. Los componentes de emisión más abundantes en moscas de 5-6 y 11-12 días de edad fueron etil (E) - y octenoato, acetato de etilo, acetato de geranilo, 1-pirrolina y (E, E) - α -farneseno. Heath et al. (1991) analizaron los tres componentes principales de las feromonas de machos de la mosca de la fruta del Mediterráneo ethyl- (E) -3-octenoate, acetato de geranilo y (E, E) - α -farneseno en el laboratorio y entre las moscas de los machos silvestres criadas. Descubrieron que los tres compuestos emitidos forman una mezcla sintética que libera los compuestos en una proporción similar a la que liberan las moscas macho silvestres.

Según Cossé et al. (1995), el α -farneseno, es un componente común de la feromona masculina de *C. capitata* masculino. Los compuestos de octanoato de metilo se han identificado en las feromonas de moscas masculinas y se liberan durante la etapa de "*calling*" de los machos (Gonçalves et al., 2006; Wicker-Thomas, 2007). El hexanoato de metilo y los ésteres metílicos se implicaron en la comunicación intraespecífica de mosca (Warthen et al., 1997).

Las feromonas son sustancias segregadas por un individuo cuya liberación influye en el comportamiento o fisiología de otros de la misma especie (Karlson & Lüscher, 1959; Wyatt, 2003). Las señales olfativas están compuestas por feromonas volátiles y semi-volátiles, éstas actúan en primera instancia ya que son percibidas a distancia por el sistema olfativo. Se han identificado feromonas asociadas a la agresión en insectos, en particular el lípido 11-cis-vaccenyl acetate, también llamado cis-vaccenyl acetate (cVA) (Ha & Smith, 2006). A distancia, esta señal promueve la agregación de machos, mientras que en cercanía promueve la agresión macho-macho. En *Drosophila*, se ha demostrado que la ausencia de cVA indica al macho que la mosca a su lado es una hembra y estimula su cortejo (Fernández & Kravitz, 2013). Las feromonas no-volátiles son percibidas vía receptores gustativos localizados en patas y piezas (Fernández & Kravitz, 2013), se necesita de un contacto directo, por eso son consideradas de segunda instancia (Touhara & Vosshall, 2009).

Los principales hidrocarburos presentes en la cutícula en machos drosófilidos son el (Z)-7-tricosene and (Z)-7-pentacosene (Ebbs & Amrein, 2007). Estos hidrocarburos serían censados a través de los receptores gustativos, presentes en los pelos gustativos de patas y piezas bucales. Wang et al. (2011) reportó que además del cVA, el 7-tricoseno es necesario para la agresión macho-macho.

Anexo estadístico

Capítulo 3

Análisis Trehalosa

Modelado de la varianza

```
> modelo_varIdent<-gls(trehalosa~Edad, weights=varIdent(form=~1|Edad), data=Datos)
> anova(modelo_varIdent)
```

```
Denom. DF: 10
      numDF F-value p-value
(Intercept) 1 900.7984 <.0001
Edad         4  5.5557  0.0128
```

Simultaneous Tests for General Linear Hypotheses

Multiple Comparisons of Means: Tukey Contrasts

```
Fit: gls(model = trehalosa ~ Edad, data = Datos, weights = varIdent(form = ~1 | Edad))
```

Linear Hypotheses:

	Estimate	Std. Error	z value	Pr(> z)
AE5 - AE1 == 0	-0.17247	0.53493	-0.322	0.99713
af1 - AE1 == 0	-0.95583	0.31343	-3.050	0.01518 *
af3 - AE1 == 0	-0.84143	0.31504	-2.671	0.04650 *
e - AE1 == 0	-0.42547	0.33594	-1.267	0.67340
af1 - AE5 == 0	-0.78337	0.44281	-1.769	0.34716
af3 - AE5 == 0	-0.66897	0.44395	-1.507	0.51235
e - AE5 == 0	-0.25300	0.45901	-0.551	0.97791
af3 - af1 == 0	0.11440	0.09579	1.194	0.71976
e - af1 == 0	0.53037	0.15093	3.514	0.00308 **
e - af3 == 0	0.41597	0.15424	2.697	0.04330 *

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

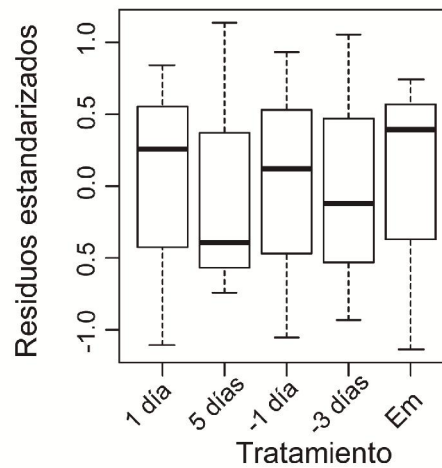
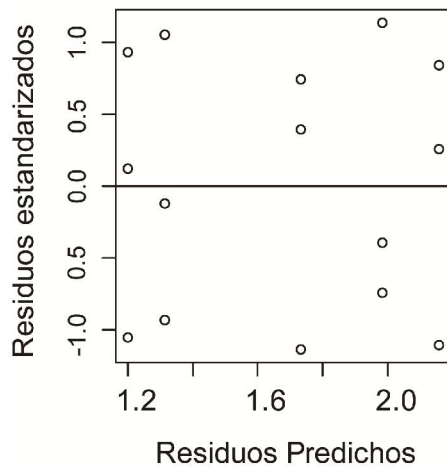
Variance function:

Structure: Different standard deviations per stratum

Formula: ~1 | Edad

Parameter estimates:

	af3	af1	e	AE1	AE5
	1.0000000	0.8954157	1.9160086	4.2996935	6.1398223



Análisis Glucógeno

```
> modelo_2<-gls(glucogeno~Edad, data=Datos)
> anova(modelo_2)
Denom. DF: 10
      numDF  F-value p-value
(Intercept)    1 504.9587 <.0001
Edad           4  35.5523 <.0001

Simultaneous Tests for General Linear Hypotheses

Multiple Comparisons of Means: Tukey Contrasts

Fit: gls(model = glucogeno ~ Edad, data = Datos)

Linear Hypotheses:
      Estimate Std. Error z value Pr(>|z|)
AE5 - AE1 == 0   18.767    2.284   8.215 < 0.001 ***
af1 - AE1 == 0    3.600    2.284   1.576  0.51295
af3 - AE1 == 0    2.467    2.284   1.080  0.81707
e - AE1 == 0     -7.667    2.284  -3.356  0.00698 **
af1 - AE5 == 0   -15.167    2.284  -6.639 < 0.001 ***
af3 - AE5 == 0   -16.300    2.284  -7.135 < 0.001 ***
e - AE5 == 0    -26.433    2.284 -11.571 < 0.001 ***
af3 - af1 == 0   -1.133    2.284  -0.496  0.98775
e - af1 == 0    -11.267    2.284  -4.932 < 0.001 ***
e - af3 == 0    -10.133    2.284  -4.436 < 0.001 ***
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
(Adjusted p values reported -- single-step method)
```

Análisis Lípidos

```
> anova(modelo_2)
Denom. DF: 10
      numDF  F-value p-value
(Intercept)    1 2197.507 <.0001
Edad           4  25.838 <.0001

Simultaneous Tests for General Linear Hypotheses

Multiple Comparisons of Means: Tukey Contrasts

Fit: gls(model = lipidos ~ Edad, data = Datos)

Linear Hypotheses:
      Estimate Std. Error z value Pr(>|z|)
AE5 - AE1 == 0   635.1    137.6   4.616 < 1e-04 ***
af1 - AE1 == 0   -72.7    137.6  -0.528  0.984478
af3 - AE1 == 0    85.7    137.6   0.623  0.971475
e - AE1 == 0    -751.3    137.6  -5.460 < 1e-04 ***
af1 - AE5 == 0   -707.8    137.6  -5.144 < 1e-04 ***
af3 - AE5 == 0   -549.4    137.6  -3.993  0.000611 ***
e - AE5 == 0   -1386.4    137.6 -10.076 < 1e-04 ***
af3 - af1 == 0    158.4    137.6   1.151  0.779064
e - af1 == 0    -678.6    137.6  -4.932 < 1e-04 ***
e - af3 == 0    -837.0    137.6  -6.083 < 1e-04 ***
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
(Adjusted p values reported -- single-step method)
```

Capítulo 4

Análisis del tiempo de emergencia Ceratitis vs Drosophila

```
> modelo_varIdent<-gls(em~mosca, weights=varIdent(form=~1|mosca), data=Datos)
> anova(modelo_varIdent)
Denom. DF: 55
      numDF  F-value p-value
(Intercept)    1 211.74935 <.0001
mosca          1  99.85359 <.0001
```



```

> modelo_varIdent
Generalized least squares fit by REML
Model: em ~ mosca
Data: Datos
Log-restricted-likelihood: -42.99408

Coefficients:
(Intercept) moscadrosophila
1.981818 -1.448485

```

Análisis del PEA Ceratitis vs Drosophila.

```

> modelo_varIdent<-gls(PEA~mosca, weights=varIdent(form=~1|mosca), data=Datos)
> anova(modelo_varIdent)
Denom. DF: 57
      numDF  F-value p-value
(Intercept)    1 664.9941 <.0001
mosca          1  2.6940 0.1062
> modelo_varIdent
Generalized least squares fit by REML
Model: PEA ~ mosca
Data: Datos
Log-restricted-likelihood: -284.2833

Coefficients:
(Intercept) moscadrosophila
107.38235 -17.07435

Variance function:
Structure: Different standard deviations per stratum
Formula: ~1 | mosca
Parameter estimates:
Ceratitis drosophila
1.00000 1.79831
Degrees of freedom: 59 total; 57 residual
Residual standard error: 26.10757

```

Capítulo 6

Análisis descriptivo

```
#Asociacion entre variables
(round(cov <- cov(data1),2))
(round(cor <- cor(data1),2))

library(stats)
heatmap(cor)

#Descriptiva 2D
plot(data1)

> (round(cov <- cov(data1),2))
      SN    SP    CN    CP
SN 5.91  0.08  5.52  0.82
SP 0.08  5.99 -0.98  1.11
CN 5.52 -0.98 11.58  1.68
CP 0.82  1.11  1.68  2.55

> (round(cor <- cor(data1),2))
      SN    SP    CN    CP
SN 1.00  0.01  0.67  0.21
SP 0.01  1.00 -0.12  0.28
CN 0.67 -0.12  1.00  0.31
CP 0.21  0.28  0.31  1.00

> library(stats)
> heatmap(cor)
> plot(data1)

> library(psych)
> tr(cov(data1))
[1] 26.02748
> det(cov(data1))
[1] 449.6283
> tr(cor(data1))
[1] 4
> det(cor(data1))
[1] 0.4308446

> tr(cov(data2))
[1] 39.2828
> det(cov(data2))
[1] 304.1921
> tr(cor(data2))
[1] 2
> det(cor(data2))
[1] 0.9916573
```

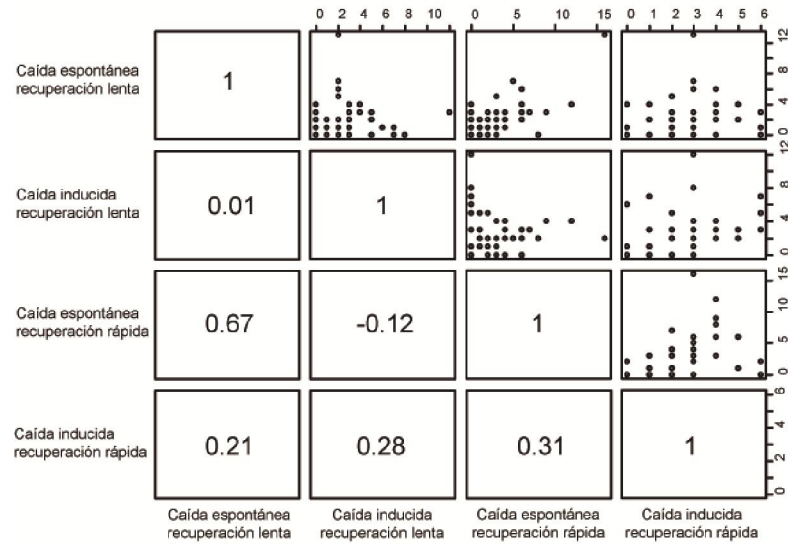


Figura 3 Análisis descriptivo de las variables caída espontánea y caída inducida. Debajo de la diagonal se encuentran los coeficientes correlación de Pearson para las distribuciones que se encuentran sobre la diagonal.

Análisis de correspondencia múltiple (MCA)

Variable	Categoría	Dimensión 1	Dimensión 2	Dimensión 3
Orden de muerte	Primero	1.334	3.218	7.121
	Segundo	4.009	2.895	8.965
	Último	0.409	9.778	0.006
Caída espontanea	Caída +++	18.959	0.0085	3.394
	Caída ++	9.593	0.660	3.011
	Caída +	0.581	0.534	11.345
Caída inducida	Caída (I) +++	0.455	0.384	5.546
	Caída (I) ++	1.207	8.102	15.201
	Caudal(I) +	0.172	13.190	2.293
Perfil visitante	Visitante +++	16.428	1.974	1.664
	Visitante ++	2.059	10.223	2.578
	Visitante +	5.784	3.874	8.441
Perfil defensivo	Defensivo +++	5.659	6.363	7.437
	Defensivo ++	2.721	9.471	16.313
	Defensivo +	16.229	0.308	1.721
Distancia recorrida	Distancia +++	0.701	16.080	0.802
	Distancia ++	4.687	12.743	3.309
	Distancia +	9.013	0.194	0.853

Tabla 6 Contribución porcentual de cada categoría para las tres primeras dimensiones del espacio multidimensional.

Modelos lineales generalizados (GLS)

Muerte lek vs aislados vs lek_aislado

	df	AIC
modelo_simple	4	326.9828

```

modelo_varIdent 6 312.6534
modelo_varPower 5 316.7344
modelo_varExp 5 317.0095

```

```
> modelo_varIdent<-gls(muerte~clase, weights=varIdent(form=~1|), data=Datos)
```

```
> anova(modelo_varIdent)
```

```

Denom. DF: 32
      numDF  F-value p-value
(Intercept) 1 200.35697 <.0001
clase        2  14.20003 <.0001

```

```
> summary(modelo_varIdent)
```

```

Generalized least squares fit by REML
Model: muerte ~ clase
Data: Datos
      AIC      BIC    logLik
312.6534 321.4478 -150.3267

```

```
Variance function:
```

```
Structure: Different standard deviations per stratum
```

```
Formula: ~1 | clase
```

```
Parameter estimates:
```

```

      Lek      Aislado Lek_aislado
1.000000 1.467173 3.420936

```

```
Coefficients:
```

```

      Value Std.Error t-value p-value
(Intercept) 76.55556 7.164953 10.684725 0.0000
claseLek    -40.48889 8.102207 -4.997266 0.0000
claseLek_aislado -3.01010 16.723879 -0.179988 0.8583

```

```
Correlation:
```

```

      (Intr) clasLk
claseLek    -0.884
claseLek_aislado -0.428 0.379

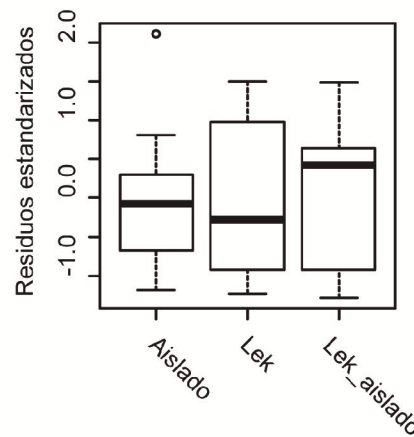
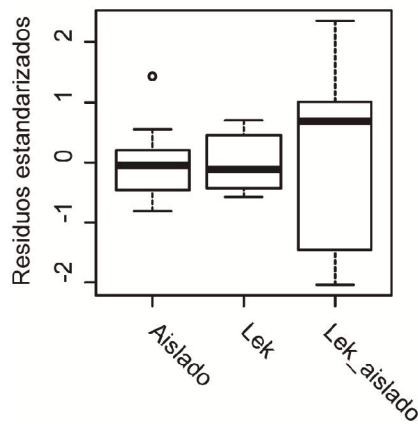
```

```
Standardized residuals:
```

```

      Min      Q1      Med      Q3      Max
-1.28785600 -0.84344440 -0.07236872 0.81304797 2.11420052

```



```

> multCompTukey <- glht(modelo_varPower, linfct = mcp(clase = "Tukey"))
> summary(multCompTukey)

```

```
Simultaneous Tests for General Linear Hypotheses
```

```
Multiple Comparisons of Means: Tukey Contrasts
```

```
Fit: gls(model = muerte ~ clase, data = Datos, weights = varComb(varPower()))
```

```
Linear Hypotheses:
```

	Estimate	Std. Error	z value	Pr(> z)	
<i>Lek</i> - Aislado == 0	-40.49	14.39	-2.814	0.01301	*
<i>Lek_aislado</i> - Aislado == 0	-3.01	18.26	-0.165	0.98455	
<i>Lek_aislado</i> - <i>Lek</i> == 0	37.48	12.48	3.004	0.00735	**

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
(Adjusted p values reported -- single-step method)

Análisis de modelos generalizados mixtos (GLMM)

Perfil defensivo vs caídas espontáneas

```
> Datos2 <- read.delim("defensivobloque.txt")
> View(Datos2)

> library(lme4)
> m1 <- glmer(NroCaida ~ Def +(1|bloque) , family = poisson, data = Datos2)
> summary(m1)
Generalized linear mixed model fit by maximum likelihood (Laplace
Approximation) ['glmerMod']
Family: poisson ( log )
Formula: NroCaida ~ Def + (1 | bloque)
Data: Datos2

            AIC      BIC    logLik deviance df.resid
            198.9    205.6     -95.5   190.9      35

Scaled residuals:
    Min       1Q   Median       3Q      Max
-2.01304 -0.71664 -0.04503  0.55775  2.37285

Random effects:
 Groups Name      Variance Std.Dev.
 bloque (Intercept) 0.6208   0.7879
Number of obs: 39, groups: bloque, 13

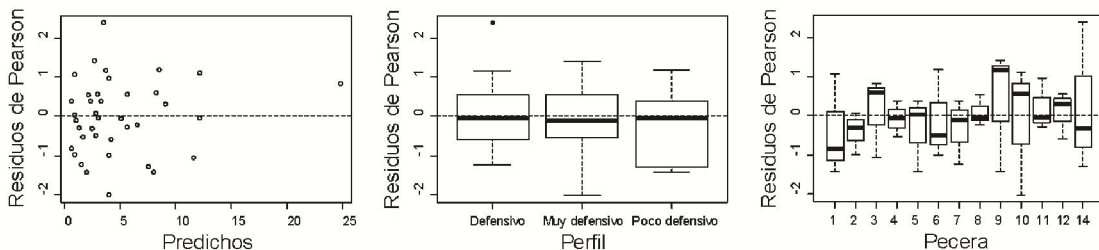
Fixed effects:
              Estimate Std. Error z value Pr(>|z|)
(Intercept)    1.0421    0.2682   3.886 0.000102 ***
DefMuy defensivo -0.3365    0.2186  -1.540 0.123668
DefPoco defensivo  0.7621    0.1708   4.461 8.16e-06 ***
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Correlation of Fixed Effects:
          (Intr) DfMydf
DefMuydfnsv -0.340
DefPocdfnsv -0.434  0.533

>#Supuestos
>#Sobredispersión
> e4 <- resid(m1, type = "pearson")
> k <- length(fixef(m1)) + 2 #parametros estimados (3 coef + 2 var)
> n <- nrow(Datos2)
> dispersion <-sum(e4^2) / (n - k)
> dispersion

[1] 1.016787
```

Herramientas diagnóstico, Gráficos de residuos. Caídas No inducidas:



```
> library(multcomp)
> multCompTukey2 <- glht(m1, linfct = mcp(Def = "Tukey"))
> summary(multCompTukey2)
```

```
Simultaneous Tests for General Linear Hypotheses
Multiple Comparisons of Means: Tukey Contrasts
Fit: glmer(formula = NroCaida ~ Def + (1 | bloque), data = Datos2,
```

```

family = poisson)
Linear Hypotheses:
              Estimate Std. Error z value Pr(>|z|)
Muy defensivo - Defensivo == 0      -0.3365    0.2186  -1.540    0.269
Poco defensivo - Defensivo == 0       0.7621    0.1708   4.461 <1e-04 ***
Poco defensivo - Muy defensivo == 0   1.0986    0.1927   5.700 <1e-04 ***
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
                (Adjusted p values reported -- single-step method)

```

Perfil defensivo vs caídas inducidas

```

> m1 <- glmer(NroCaidaspelea ~ Def +(1|bloque) , family = poisson, data =
Datos2)
> summary(m1)
Generalized linear mixed model fit by maximum likelihood (Laplace
Approximation) ['glmerMod']
Family: poisson (log)
Formula: NroCaidaspelea ~ Def + (1 | bloque)
Data: Datos2

```

AIC	BIC	logLik	deviance	df.resid
207.0	213.6	-99.5	199.0	35

```

Scaled residuals:
   Min       1Q   Median       3Q      Max
-1.8901 -0.7974 -0.1723  0.5885  1.9559

```

```

Random effects:
Groups Name      Variance Std.Dev.
bloque (Intercept) 0.2748   0.5242
Number of obs: 39, groups: bloque, 13

```

```

Fixed effects:
              Estimate Std. Error z value Pr(>|z|)
(Intercept)    1.5452    0.1926   8.023 1.03e-15 ***
DefMuy defensivo  0.1226    0.1637   0.749   0.454
DefPoco defensivo -0.1566    0.1756  -0.892   0.373
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

```

```

Correlation of Fixed Effects:
      (Intr) DfMydf
DefMuydfnsv -0.451
DefPocdfnsv -0.420  0.495

```

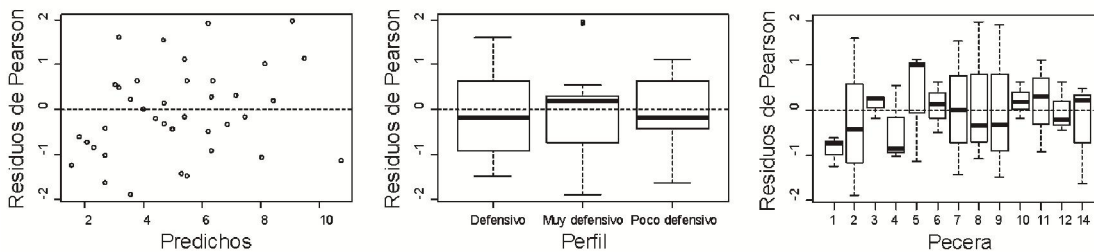
```

> e4 <- resid(m1, type = "pearson")
> k <- length(fixef(m1)) + 2 #parametros estimados (3 coef + 2 var)
> n <- nrow(Datos2)
> dispersion <- sum(e4^2) / (n - k)
> dispersion

```

```
[1] 1.091459
```

Herramientas diagnóstico, Gráficos de residuos. Caídas inducidas:



```

> library(multcomp)
> multCompTukey2 <- glht(m1, linfct = mcp (Def = "Tukey"))
> summary(multCompTukey2)
      Simultaneous Tests for General Linear Hypotheses
Multiple Comparisons of Means: Tukey Contrasts
Fit: glmer(formula = NroCaidaspelea ~ Def + (1 | bloque), data = Datos2,
  family = poisson)
Linear Hypotheses:

```

	Estimate	Std. Error	z value	Pr(> z)
Muy defensivo - Defensivo == 0	0.1226	0.1637	0.749	0.734
Poco defensivo - Defensivo == 0	-0.1566	0.1756	-0.892	0.645
Poco defensivo - Muy defensivo == 0	-0.2792	0.1709	-1.634	0.231

```

(Adjusted p values reported -- single-step method)

```


Perfil visitante vs. caídas espontáneas

```
> Datos2 <- read.delim("visitantebloque.txt")
> library(lme4)
> m1 <- glmer(NroCaida ~ Agr +(1|bloque) , family = poisson, data = Datos2)
> summary(m1)
Generalized linear mixed model fit by maximum likelihood (Laplace
Approximation) ['glmerMod']
Family: poisson ( log )
Formula: NroCaida ~ Agr + (1 | bloque)
Data: Datos2

           AIC      BIC    logLik deviance df.resid
       211.3    218.0   -101.7    203.3      35

Scaled residuals:
   Min       1Q   Median       3Q      Max
-1.8175 -0.8933  0.0414  0.4531  2.0012

Random effects:
 Groups Name      Variance Std.Dev.
 bloque (Intercept) 0.5764   0.7592
Number of obs: 39, groups: bloque, 13

Fixed effects:
              Estimate Std. Error z value Pr(>|z|)
(Intercept)    1.3083    0.2523   5.186 2.15e-07 ***
AgrMuy agresivo  0.5173    0.1586   3.260 0.00111 **
AgrPoco agresivo -0.2353    0.1890  -1.245 0.21311
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
Correlation of Fixed Effects:
          (Intr) AgrMya
AgrMuyagrsv -0.394
AgrPocagrsv -0.331  0.526
> #Supuestos
> #Sobredispersión
> e4 <- resid(m1, type = "pearson")
> k <- length(fixef(m1)) + 2 #parametros estimados (3 coef + 2 var)
> n <- nrow(Datos2)
> dispersion <- sum(e4^2) / (n - k)
> dispersion
[1] 1.135182

> library(multcomp)
> multCompTukey2 <- glht(m1, linfct = mcp (Agr = "Tukey"))
> summary(multCompTukey2)

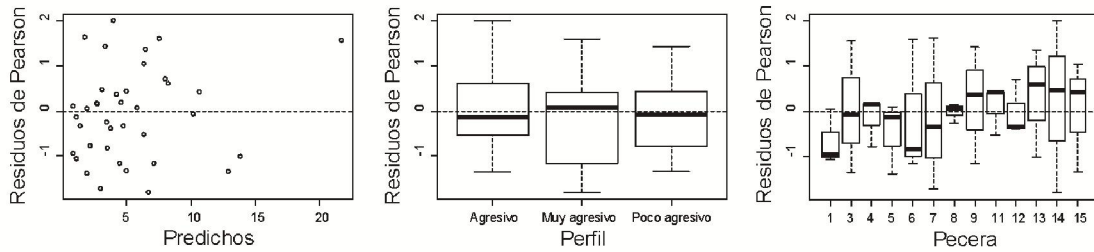
           Simultaneous Tests for General Linear Hypotheses

Multiple Comparisons of Means: Tukey Contrasts

Fit: glmer(formula = NroCaida ~ Agr + (1 | bloque), data = Datos2,
family = poisson)

Linear Hypotheses:
              Estimate Std. Error z value Pr(>|z|)
Muy agresivo - Agresivo == 0    0.5173    0.1586   3.260 0.00302 **
Poco agresivo - Agresivo == 0   -0.2353    0.1890  -1.245 0.42490
Poco agresivo - Muy agresivo == 0 -0.7526    0.1713  -4.393 < 1e-04 ***
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
(Adjusted p values reported -- single-step method)
```

Herramientas diagnóstico, Gráficos de residuos. Caídas No inducidas:



Perfil visitante vs. caídas inducidas

```

> Datos2 <- read.delim("visitantebloque.txt")
> library(lme4)
> m1 <- glmer(NroCaidaspelea ~ Agr +(1|bloque) , family = poisson, data =
Datos2)
> summary(m1)
Generalized linear mixed model fit by maximum likelihood (Laplace
Approximation) ['glmerMod']
Family: poisson ( log )
Formula: NroCaidaspelea ~ Agr + (1 | bloque)
Data: Datos2

      AIC      BIC   logLik deviance df.resid
  213.6   220.6  -102.8   205.6     38

Scaled residuals:
  Min       1Q   Median       3Q      Max
-1.62365 -0.68533 -0.06581  0.43289  1.86056

Random effects:
 Groups Name      Variance Std.Dev.
 bloque (Intercept) 0.2282   0.4777
Number of obs: 42, groups: bloque, 14

Fixed effects:
              Estimate Std. Error z value Pr(>|z|)
(Intercept)    1.7578    0.1689  10.405 <2e-16 ***
AgrMuy agresivo -0.1304    0.1528  -0.853  0.3936
AgrPoco agresivo -0.3727    0.1636  -2.278  0.0227 *
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Correlation of Fixed Effects:
      (Intr) AgrMya
AgrMuyagrsv -0.423
AgrPocagrsv -0.395  0.437
> #Supuestos
> #Sobredispersión
> e4 <- resid(m1, type = "pearson")
> k <- length(fixef(m1)) + 2 #parametros estimados (3 coef + 2 var)
> n <- nrow(Datos2)
> dispersion <-sum(e4^2) / (n - k)
> dispersion
[1] 0.8371149

> library(multcomp)
> multCompTukey2 <- glht(m1, linfct = mcp (Agr = "Tukey"))
> summary(multCompTukey2)

```

Simultaneous Tests for General Linear Hypotheses

Multiple Comparisons of Means: Tukey Contrasts

Fit: glmer(formula = NroCaidaspelea ~ Agr + (1 | bloque), data = Datos2, family = poisson)

Linear Hypotheses:

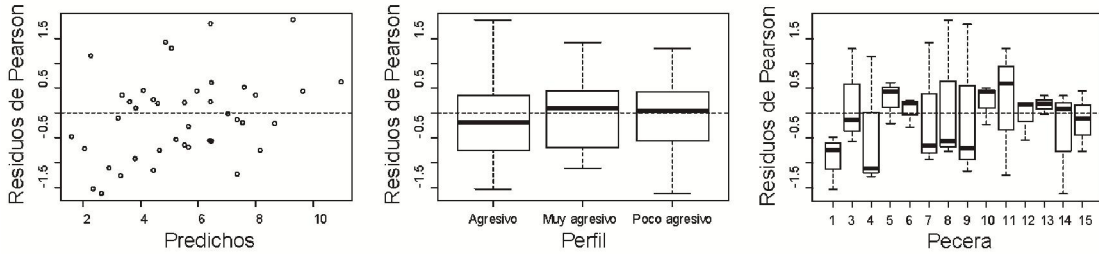
	Estimate	Std. Error	z value	Pr(> z)
Muy agresivo - Agresivo == 0	-0.1304	0.1528	-0.853	0.6695

```

Poco agresivo - Agresivo == 0      -0.3727    0.1636  -2.278    0.0587 .
Poco agresivo - Muy agresivo == 0 -0.2423    0.1682  -1.441    0.3194
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
(Adjusted p values reported -- single-step method)

```

Herramientas diagnóstico, Gráficos de residuos. Caídas inducidas.



Modelos lineales generalizados (GLM)

Lek vs Solitario

```

Call:
glm(formula = NroCaida ~ Cat, family = poisson, data = Datos)

```

```

Deviance Residuals:
    Min       1Q   Median       3Q      Max
-2.15005  -1.22474   0.03217   0.60918   1.95391

```

```

Coefficients:
            Estimate Std. Error z value Pr(>|z|)
(Intercept) -0.2877    0.3333  -0.863    0.388
CatLek      1.7413    0.3575   4.871 1.11e-06 ***
---

```

```

Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

```

```

Null deviance: 74.024 on 25 degrees of freedom
Residual deviance: 39.353 on 24 degrees of freedom
Devianza =46.7%

```

```

> disper<- (dispersion<-sum(resid(modpoisson,
type="pearson")^2/modpoisson$df.residual))
> disper
[1] 1.47817

```

Perfil defensor vs. muerte

Como no se cumplió el supuesto de homocedasticidad para la variable "muerte" fue necesario modelar la varianza. Se utilizó el método de modelos lineales generales mixtos (GLMM). Se utilizó el valor de AIC como criterio de elección del modelo.

```

      df      AIC
modelo_simple  4 349.4377
modelo_varIdent 7 344.9199
modelo_varPower 6 343.5996
modelo_varExp  6 344.1154

> modelo_varPower<-lme(Muerte~fDef,random = ~1|bloque,
weights=varComb(varPower()), data=Datos)

> anova(modelo_varPower)
      numDF denDF  F-value p-value
(Intercept)    1    24 107.57565 <.0001
fDef           2    24  2.77909  0.0821
> summary(modelo_varPower)
Linear mixed-effects model fit by REML
Data: Datos
      AIC      BIC    logLik
 343.5996 353.2651 -165.7998

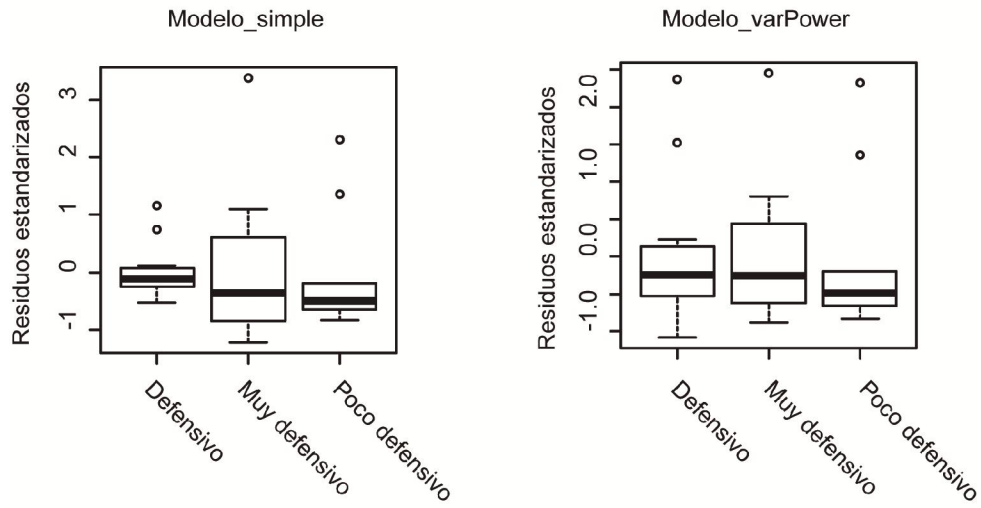
Random effects:
Formula: ~1 | bloque
      (Intercept)  Residual
StdDev: 0.009645255 0.03482908

Combination of variance functions:
Structure: Power of variance covariate
Formula: ~fitted(.)
Parameter estimates:
  power
1.836934
Fixed effects: Muerte ~ fDef
      Value Std.Error DF  t-value p-value
(Intercept)  22.61537  2.971129 24  7.611712  0.0000
fDefMuy defensivo 17.15385  8.890923 24  1.929367  0.0656
fDefPoco defensivo 10.67033  6.537419 24  1.632193  0.1157
Correlation:
      (Intr) fDfMyd
fDefMuy defensivo -0.334
fDefPoco defensivo -0.454  0.152

Standardized within-Group Residuals:
      Min      Q1      Med      Q3      Max
-1.0842769 -0.6546463 -0.3374896  0.1525892  2.4568524

Number of Observations: 40
Number of Groups: 14
```

Residuos estandarizados en función del perfil del animal para el modelo “simple” y el modelo con mejor ajuste (varPower):



```
> multCompTukey <- glht(modelo_varPower, linfct = mcp(fDef = "Tukey"))
> summary(multCompTukey)
```

Simultaneous Tests for General Linear Hypotheses

Multiple Comparisons of Means: Tukey Contrasts

```
Fit: lme.formula(fixed = Muerte ~ fDef, data = Datos, random = ~1 |
  bloque, weights = varComb(varPower()))
```

Linear Hypotheses:

	Estimate	Std. Error	z value	Pr(> z)
Muy defensivo - Defensivo == 0	17.154	8.891	1.929	0.126
Poco defensivo - Defensivo == 0	10.670	6.537	1.632	0.225
Poco defensivo - Muy defensivo == 0	-6.484	10.204	-0.635	0.795

(Adjusted p values reported -- single-step method)

Perfil defensor vs. distancia

Como no se cumplió el supuesto de homocedasticidad para la variable “distancia” fue necesario modelar la varianza. Se utilizó el método de modelos lineales generales mixtos (GLMM). Se utilizó el valor de AIC como criterio de elección del modelo.

```

      df      AIC
modelo_simple  4 522.2706
modelo_varIdent 7 518.1863
modelo_varPower 6 516.2289
modelo_varExp  6 516.2787

> modelo_varPower<-lme(Distance~fDef,random = ~1|bloque,
weights=varComb(varPower()), data=Datos)
> anova(modelo_varPower)
      numDF denDF  F-value p-value
(Intercept)    1    24 186.79957 <.0001
fDef            2    24  1.67208  0.209
> summary(modelo_varPower)
Linear mixed-effects model fit by REML
Data: Datos
      AIC      BIC    logLik
516.2289 525.8944 -252.1145

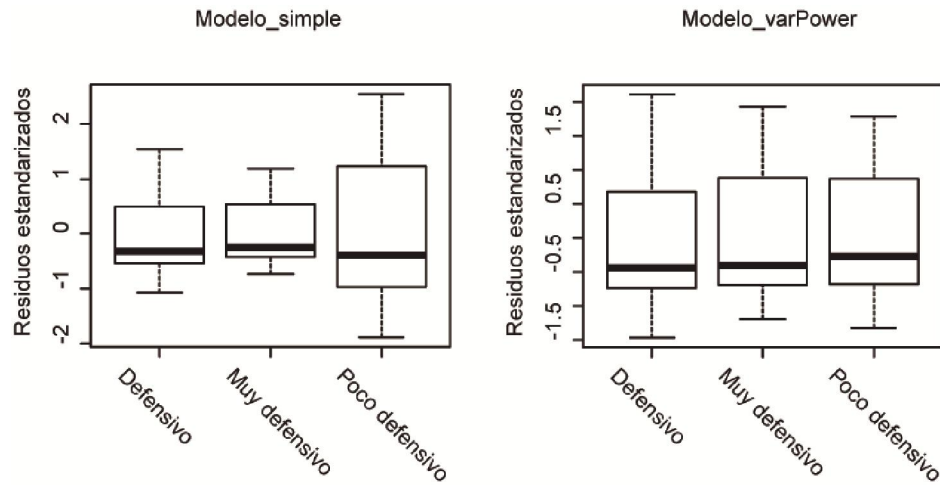
Random effects:
Formula: ~1 | bloque
      (Intercept)      Residual
StdDev: 0.0002221487 0.0006249027

Combination of variance functions:
Structure: Power of variance covariate
Formula: ~fitted(.)
Parameter estimates:
      power
2.098867
Fixed effects: Distance ~ fDef
      Value Std.Error DF  t-value p-value
(Intercept) 384.1538  46.06513 24  8.339363 0.0000
fDefMuy defensivo -30.0769  60.24114 24 -0.499275 0.6221
fDefPoco defensivo 142.7033  97.68605 24  1.460836 0.1570
Correlation:
      (Intr) fDfMyd
fDefMuy defensivo -0.765
fDefPoco defensivo -0.472  0.361

Standardized Within-Group Residuals:
      Min      Q1      Med      Q3      Max
-1.4700077 -0.7264358 -0.3005032  0.8044000  2.1123835

Number of Observations: 40
Number of Groups: 14
```

Residuos estandarizados en función del perfil del animal para el modelo “simple” y el modelo con mejor ajuste (varPower):



```
> multCompTukey <- glht(modelo_varPower, linfct = mcp(fDef = "Tukey"))
> summary(multCompTukey)
```

Simultaneous Tests for General Linear Hypotheses

Multiple Comparisons of Means: Tukey Contrasts

```
Fit: lme.formula(fixed = Distance ~ fDef, data = Datos, random = ~1 |
bloque, weights = varComb(varPower()))
```

Linear Hypotheses:

	Estimate	Std. Error	z value	Pr(> z)
Muy defensivo - Defensivo == 0	-30.08	60.24	-0.499	0.869
Poco defensivo - Defensivo == 0	142.70	97.69	1.461	0.302
Poco defensivo - Muy defensivo == 0	172.78	94.49	1.829	0.155

(Adjusted p values reported -- single-step method)

Perfil visitante vs muerte

Como no se cumplió el supuesto de homocedasticidad para la variable "muerte" fue necesario modelar la varianza. Se utilizó el método de modelos lineales generales mixtos (GLM). Se utilizó el valor de AIC como criterio de elección del modelo.

```

      df  AIC
modelo_simple  4 355.0494
modelo_varIdent 7 328.6030
modelo_varPower 6 329.7688
modelo_varExp  6 331.3931

> modelo_varIdent<-lme(Muerte~fAgr,random = ~1|bloque,
weights=varIdent(form=~1|fAgr), data=Datos)
> anova(modelo_varIdent)
      numDF denDF  F-value p-value
(Intercept)  1   24 395.9714 <.0001
fAgr         2   24  4.8292  0.0173
> modelo_varIdent
Linear mixed-effects model fit by REML
Data: Datos
Log-restricted-likelihood: -157.3015
Fixed: Muerte ~ fAgr
      (Intercept) fAgrMuy agresivo fAgrPoco agresivo
      36.384615  -14.692308  4.472527

Random effects:
Formula: ~1 | bloque
      (Intercept) Residual
StdDev: 0.0004489764 4.150996

Variance function:
Structure: Different standard deviations per stratum
Formula: ~1 | fAgr
Parameter estimates:
Muy agresivo      Agresivo Poco agresivo
1.000000  7.328546  6.508824
Number of Observations: 40
Number of Groups: 14
> summary(modelo_varIdent)
Linear mixed-effects model fit by REML
Data: Datos
      AIC      BIC      logLik
328.603 339.8794 -157.3015

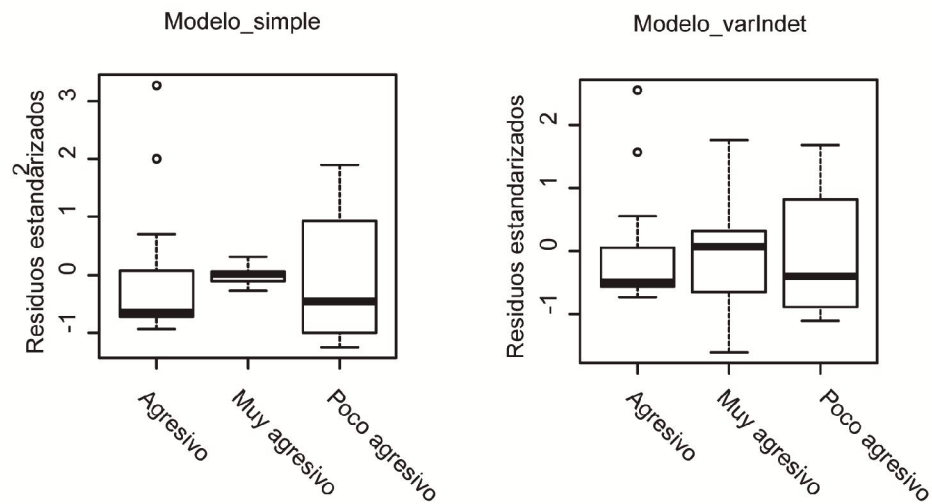
Random effects:
Formula: ~1 | bloque
      (Intercept) Residual
StdDev: 0.0004489764 4.150996

Variance function:
Structure: Different standard deviations per stratum
Formula: ~1 | fAgr
Parameter estimates:
Muy agresivo      Agresivo Poco agresivo
1.000000  7.328546  6.508824
Fixed effects: Muerte ~ fAgr
      Value Std.Error DF  t-value p-value
(Intercept)  36.38462  8.437203 24  4.312403 0.0002
fAgrMuy agresivo -14.69231  8.515388 24 -1.725383 0.0973
fAgrPoco agresivo  4.47253 11.105300 24  0.402738 0.6907
Correlation:
      (Intr) fAgrMa
fAgrMuy agresivo -0.991
fAgrPoco agresivo -0.760  0.753

Standardized Within-Group Residuals:
      Min      Q1      Med      Q3      Max
-1.6122172 -0.6621851 -0.2473018  0.4736220  2.5513947

Number of Observations: 40
Number of Groups: 14
```


Residuos estandarizados en función del perfil del animal para el modelo "simple" y el modelo con mejor ajuste (varIdent):



```
> multCompTukey <- glht(modelo_varIdent, linfct = mcp(fAgr = "Tukey"))
> summary(multCompTukey)
```

Simultaneous Tests for General Linear Hypotheses

Multiple Comparisons of Means: Tukey Contrasts

```
Fit: lme.formula(fixed = Muerte ~ fAgr, data = Datos, random = ~1 |
bloque, weights = varIdent(form = ~1 | fAgr))
```

Linear Hypotheses:

	Estimate	Std. Error	z value	Pr(> z)
Muy agresivo - Agresivo == 0	-14.692	8.515	-1.725	0.1858
Poco agresivo - Agresivo == 0	4.473	11.105	0.403	0.9104
Poco agresivo - Muy agresivo == 0	19.165	7.312	2.621	0.0224 *

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
(Adjusted p values reported -- single-step method)

Perfil visitante vs distancia

Como no se cumplió el supuesto de homocedasticidad para la variable “distancia” fue necesario modelar la varianza. Se utilizó el método de modelos lineales generales (GLM). Se utilizó el valor de AIC como criterio de elección del modelo.

```

      df      AIC
modelo_simple  4 564.6165
modelo_varIdent 7 564.2937
modelo_varPower 6 562.6642

> modelo_varPower<-lme(Distance~fAgr,random = ~1|bloque,
weights=varComb(varPower()), data=Datos)

> anova(modelo_varPower)
      numDF denDF  F-value p-value
(Intercept)    1    26 120.92420 <.0001
fAgr           2    26  4.38841 0.0228
> summary(modelo_varPower)
Linear mixed-effects model fit by REML
Data: Datos
      AIC      BIC    logLik
562.6642 572.6456 -275.3321

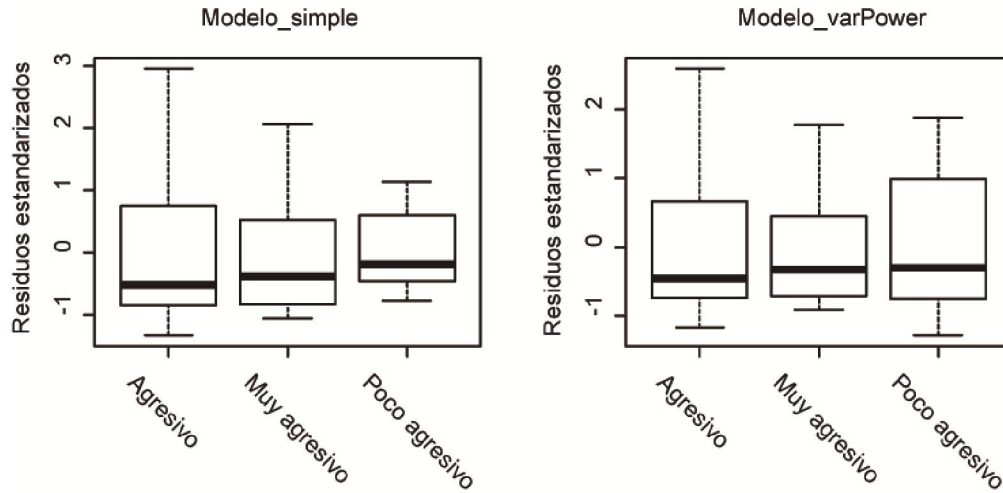
Random effects:
Formula: ~1 | bloque
      (Intercept) Residual
StdDev:  0.04981039 0.156334

Combination of variance functions:
Structure: Power of variance covariate
Formula: ~fitted(.)
Parameter estimates:
      power
1.212269
Fixed effects: Distance ~ fAgr
      Value Std.Error DF  t-value p-value
(Intercept)  527.7857  83.43362 26  6.325816 0.0000
fAgrMuy agresivo  9.7143 119.31917 26  0.081414 0.9357
fAgrPoco agresivo -215.1429 94.42960 26 -2.278341 0.0312
Correlation:
      (Intr) fAgrMa
fAgrMuy agresivo -0.699
fAgrPoco agresivo -0.884 0.618

Standardized Within-Group Residuals:
      Min      Q1      Med      Q3      Max
-1.2911133 -0.7414301 -0.3274228  0.8227453  2.6017497

Number of Observations: 42
Number of Groups: 14
```

Residuos estandarizados en función del perfil del animal para el modelo “simple” y el modelo con mejor ajuste (varPower):



```
> multCompTukey <- glht(modelo_varPower, linfct = mcp(fAgr = "Tukey"))
> summary(multCompTukey)
```

Simultaneous Tests for General Linear Hypotheses

Multiple Comparisons of Means: Tukey Contrasts

```
Fit: lme.formula(fixed = Distance ~ fAgr, data = Datos, random = ~1 |
bloque, weights = varComb(varPower()))
```

Linear Hypotheses:

	Estimate	Std. Error	z value	Pr(> z)
Muy agresivo - Agresivo == 0	9.714	119.319	0.081	0.9963
Poco agresivo - Agresivo == 0	-215.143	94.430	-2.278	0.0575 .
Poco agresivo - Muy agresivo == 0	-224.857	96.082	-2.340	0.0491 *

```
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
(Adjusted p values reported -- single-step method)
```

Bibliografía

- Abruzzi KC, Zadina A, Luo W, Wiyanto E, Rahman R, Guo F, Shafer O & Rosbash M (2017) RNA-seq analysis of *Drosophila* clock and non-clock neurons reveals neuron-specific cycling and novel candidate neuropeptides. *PLOS Genetics* 13: e1006613. doi:10.1371/journal.pgen.1006613.
- Agrawal S, Safarik S & Dickinson M (2014) The relative roles of vision and chemosensation in mate recognition of *Drosophila melanogaster*. *The Journal of Experimental Biology* 217: 2796. doi:10.1242/jeb.105817.
- Agrell I (1953) The Aerobic and Anaerobic Utilization of Metabolic Energy During Insect Metamorphosis. *Acta Physiologica Scandinavica* 28: 306-335. doi:10.1111/j.1748-1716.1953.tb00984.x.
- Aguila JR, Suszko J, Gibbs AG & Hoshizaki DK (2007) The role of larval fat cells in adult *Drosophila melanogaster*. *Journal of Experimental Biology* 210: 956. doi:10.1242/jeb.001586.
- Ahn S-J, Vogel H & Heckel DG (2012) Comparative analysis of the UDP-glycosyltransferase multigene family in insects. *Insect Biochem Mol Biol* 42: 133-147. doi:https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2011.11.006.
- Ajayi A, Yu X, Lindberg S, Langel U & Strom AL (2012) Expanded ataxin-7 cause toxicity by inducing ROS production from NADPH oxidase complexes in a stable inducible Spinocerebellar ataxia type 7 (SCA7) model. *BMC Neurosci* 13: 86. doi:10.1186/1471-2202-13-86.
- Akasaka S, Sasaki K, Harano K-i & Nagao T (2010) Dopamine enhances locomotor activity for mating in male honeybees (*Apis mellifera* L.). *Journal of Insect Physiology* 56: 1160-1166. doi:https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2010.03.013.
- Alcock J (1987) Leks and hilltopping in insects. *Journal of Natural History* 21: 319-328. doi:10.1080/00222938700771041.
- Aluja M & Birke A (1993) Habitat Use by Adults of *Anastrepha obliqua* (Diptera: Tephritidae) in a Mixed Mango and Tropical Plum Orchard. *Annual Entomology Society America* 86: 799-812. doi:10.1093/aesa/86.6.799.
- Aluja M & Norrbom AL (1999) Fruit flies (Tephritidae): phylogeny and evolution of behavior Boca Raton. CRC Press.
- Amdam G & Page R (2005) Intergenerational transfers may have decoupled physiological and chronological age in a eusocial insect. *Ageing research reviews* 4: 398-408. doi:10.1016/j.arr.2005.03.007.
- Antebi A (2007) Genetics of aging in *Caenorhabditis elegans*. *PLoS Genet* 3: 1565-1571. doi:10.1371/journal.pgen.0030129. doi:10.1371/journal.pgen.0030129.
- Arita H. L & Kaneshiro K (1985) The Dynamics of the Lek System and Mating Success in Males of the Mediterranean Fruit Fly, *Ceratitidis capitata* (Wiedemann). *Proceedings, Hawaiian Entomological Society*. 2858: 39-47.
- Arita H. L & Kaneshiro K (1988) Body Size and Differential Mating Success between Males of Two Populations of the Mediterranean Fruit Fly. *Pacific Science* 42: 173-177.
- Arita H. L & Kaneshiro K (1989) Sexual Selection and Lek Behavior in the Mediterranean Fruit Fly, *Ceratitidis capitata* (Diptera: Tephritidae). *Pacific Science* 43: 135-143.
- Arrese EL & Soulages JL (2010) Insect fat body: energy, metabolism, and regulation. *Annual Review of Entomology* 55: 207-225. doi:10.1146/annurev-ento-112408-085356.

- Arya GH, Weber AL, Wang P, Magwire MM, Negron YLS, Mackay TFC & Anholt RRH (2010) Natural variation, functional pleiotropy and transcriptional contexts of odorant binding protein genes in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 186: 1475-1485. doi:10.1534/genetics.110.123166.
- Aspbury AS & Gibson RM (2004) Long-range visibility of greater sage grouse leks: a GIS-based analysis. *Animal Behaviour* 67: 1127-1132. doi:https://doi.org/10.1016/j.anbehav.2003.06.021.
- Avery MI (1984) Lekking in birds: choice, competition and reproductive constraints. *Ibis* 126: 177-187. doi:10.1111/j.1474-919X.1984.tb07997.x.
- Bainbridge SP & Bownes M (1981) Staging the metamorphosis of *Drosophila melanogaster*. *Journal of Embryology and Experimental Morphology* 66: 57.
- Baldal EA, van der Linde K, van Alphen JJM, Brakefield PM & Zwaan BJ (2005) The effects of larval density on adult life-history traits in three species of *Drosophila*. *Mechanisms of Ageing and Development* 126: 407-416. doi:https://doi.org/10.1016/j.mad.2004.09.035.
- Barry J, McInnis D, Gates D & G Morse J (2003) Effects of Irradiation on Mediterranean Fruit Flies (Diptera: Tephritidae): Emergence, Survivorship, Lure Attraction, and Mating Competition.
- Bartussek J & Lehmann F-O (2016) Proprioceptive feedback determines visuomotor gain in *Drosophila*. *Royal Society open science* 3: 150562-150562. doi:10.1098/rsos.150562.
- Bartussek J & Lehmann F-O (2018) Sensory processing by motoneurons: a numerical model for low-level flight control in flies. *Journal of The Royal Society Interface* 15: 20180408. doi:doi:10.1098/rsif.2018.0408.
- Bayat V, Thiffault I, Jaiswal M, Tetreault M, Donti T, Sasarman F, Bernard G, Demers-Lamarche J, Dicaire MJ, Mathieu J, Vanasse M, Bouchard JP, Rioux MF, Lourenco CM, Li Z, Haueter C, Shoubridge EA, Graham BH, Brais B & Bellen HJ (2012) Mutations in the mitochondrial methionyl-tRNA synthetase cause a neurodegenerative phenotype in flies and a recessive ataxia (ARSAL) in humans. *PLoS Biol* 10: e1001288. doi:10.1371/journal.pbio.1001288.
- Beatus T, Guckenheimer JM & Cohen I (2015) Controlling roll perturbations in fruit flies. *J R Soc Interface* 12: 20150075. doi:10.1098/rsif.2015.0075.
- Becker W & Joost H-G (1998) Structural and Functional Characteristics of Dyrk, a Novel Subfamily of Protein Kinases with Dual Specificity, Vol. 62: Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology (ed. by K Moldave) Academic Press, pp. 1-17.
- Beehler BM & Foster MS (1988) Hotshots, Hotspots, and Female Preference in the Organization of Lek Mating Systems. *The American Naturalist* 131: 203-219. doi:10.1086/284786.
- Benelli G (2014a) Aggression in Tephritidae Flies: Where, When, Why? Future Directions for Research in Integrated Pest Management. *Insects* 6: 38-53. doi:10.3390/insects6010038.
- Benelli G (2014b) Aggressive Behavior and Territoriality in the Olive Fruit Fly, *Bactrocera oleae* (Rossi) (Diptera: Tephritidae): Role of Residence and Time of Day. *Journal of Insect Behavior* 27: 145-161. doi:0892-7553.
- Benelli G (2015) Aggression in Tephritidae Flies: Where, When, Why? Future Directions for Research in Integrated Pest Management. *Insects* 6: 38.
- Benelli G, Desneux N, Romano D, Conte G, Messing RH & Canale A (2015a) Contest experience enhances aggressive behaviour in a fly: when losers learn to win. *Sci Rep* 5: 9347. doi:10.1038/srep09347.
- Benelli G, Donati E, Romano D, Ragni G, Bonsignori G, Stefanini C & Canale A (2016) Is bigger better? Male body size affects wing-borne courtship signals and mating success in the

- olive fruit fly, *Bactrocera oleae* (Diptera: Tephritidae). *Insect Sci* 23: 869-880. doi:10.1111/1744-7917.12253.
- Benelli G, Romano D, Desneux N, Messing RH & Canale A (2015b) Sex differences in fighting-induced hyperaggression in a fly. *Animal Behaviour* 104: 165-174. doi:https://doi.org/10.1016/j.anbehav.2015.02.026.
- Benelli G, Romano D, Messing RH & Canale A (2015c) Population-level lateralized aggressive and courtship displays make better fighters not lovers: evidence from a fly. *Behav Processes* 115: 163-168. doi:10.1016/j.beproc.2015.04.005.
- Benito J, Houl JH, Roman GW & Hardin PE (2008) The blue-light photoreceptor CRYPTOCHROME is expressed in a subset of circadian oscillator neurons in the *Drosophila* CNS. *Journal of Biological Rhythms* 23: 296-307. doi:10.1177/0748730408318588.
- Berger SL, Kouzarides T, Shiekhhattar R & Shilatifard A (2009) An operational definition of epigenetics. *Genes & Development* 23: 781-783. doi:10.1101/gad.1787609.
- Bernal A & Kimbrell DA (2000) *Drosophila* participates in host immune defense and connects a translational regulator with innate immunity. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97: 6019. doi:10.1073/pnas.100391597.
- Berni J, Rabossi A & Quesada-Allue LA (2003) Phloxine B effect on immature stages of the Mediterranean fruit fly, *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae) (Wiedemann). *J Econ Entomol* 96: 662-668.
- Boccaccio GL & Quesada-Allué LA (1989) In vivo biosynthesis of a stage-specific cuticle glycoprotein during early metamorphosis of the medfly *Ceratitis capitata*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 164: 251-258. doi:https://doi.org/10.1016/0006-291X(89)91710-5.
- Bochicchio P, Pérez M, Quesada-Allué L & Rabossi A (2017) Poor geotaxis correlated with haematoporphyrin-induced peroxidation of brain lipids as a predictor of medfly longevity reduction. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 164: 131-140.
- Bochicchio PA (2012) Senescencia Funcional y Estrés Oxidativo en una mosca plaga, *Ceratitis capitata*. University of Buenos Aires.
- Bochicchio PA, Bodin DH, Quesada-Allué LA & Rabossi A (2013) Post-ecdysis behavior of exarate adults in *Drosophila melanogaster* and *Ceratitis capitata*. *Drosophila information service* 96: 124-127.
- Bodily KD, Morrison C, Renden RB & Broadie K (2001) A Novel Member of the Ig Superfamily, turtle, is a CNS-Specific Protein Required for Coordinated Motor Control. *Journal of Neuroscience* 21: 3113-3125.
- Boggs CL (2009) Understanding insect life histories and senescence through a resource allocation lens. *Functional Ecology* 23: 27-37. doi:10.1111/j.1365-2435.2009.01527.x.
- Boggs CL & Freeman KD (2005) Larval food limitation in butterflies: effects on adult resource allocation and fitness. *Oecologia* 144: 353-361. doi:10.1007/s00442-005-0076-6.
- Bogunovic B, Stojakovic M, Chen L & Maric M (2008) An Unexpected Functional Link between Lysosomal Thiol Reductase and Mitochondrial Manganese Superoxide Dismutase. *Journal of Biological Chemistry* 283: 8855-8862. doi:10.1074/jbc.M708998200.
- Bonafé L, Thöny B, Penzien JM, Czarnecki B & Blau N (2001) Mutations in the sepiapterin reductase gene cause a novel tetrahydrobiopterin-dependent monoamine-neurotransmitter deficiency without hyperphenylalaninemia. *American journal of human genetics* 69: 269-277. doi:10.1086/321970.
- Bonilla E, Medina-Leendertz S & Díaz S (2002) Extension of life span and stress resistance of *Drosophila melanogaster* by long-term supplementation with melatonin. *Experimental Gerontology* 37: 629-638. doi:https://doi.org/10.1016/S0531-5565(01)00229-7.

- Boyles RS, Lantz KM, Poertner S, Georges SJ & Andres AJ (2010) Presenilin Controls CBP Levels in the Adult *Drosophila* Central Nervous System. *PLoS One* 5: e14332. doi:10.1371/journal.pone.0014332.
- Bradbury & Gibson (1980) Leks and mate choice. In: *Mate Choice*, Cambridge: Cambridge University Press.
- Branson K, Robie AA, Bender J, Perona P & Dickinson MH (2009) High-throughput ethomics in large groups of *Drosophila*. *Nat Methods* 6: 451-457. doi:10.1038/nmeth.1328.
- Briceño RD, Ramos D & Eberhard WG (1996) Courtship Behavior of Male *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae) in Captivity. *The Florida Entomologist* 79: 130-143. doi:10.2307/3495810.
- Briceño RDaWGE (1999) Aggressive behavior in Medflies (*Ceratitis capitata*) and its modification by mass rearing (diptera: Tephritidae). *Journal of the Kansas entomological society* 72: 17-27.
- Broughton SJ, Piper MDW, Ikeya T, Bass TM, Jacobson J, Driege Y, Martinez P, Hafen E, Withers DJ, Leever SJ & Partridge L (2005) Longer lifespan, altered metabolism, and stress resistance in *Drosophila* from ablation of cells making insulin-like ligands. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102: 3105. doi:10.1073/pnas.0405775102.
- Brown CJ, Kaufman T, Trinidad JC & Clemmer DE (2018) Proteome changes in the aging *Drosophila melanogaster* head. *International Journal of Mass Spectrometry* 425: 36-46. doi:https://doi.org/10.1016/j.ijms.2018.01.003.
- Burger JM & Promislow DE (2006) Are functional and demographic senescence genetically independent? *Exp Gerontol* 41: 1108-1116. doi:S0531-5565(06)00272-5 [pii] 10.1016/j.exger.2006.08.008.
- Burger JMS, Hwangbo DS, Corby-Harris V & Promislow DEL (2007) The functional costs and benefits of dietary restriction in *Drosophila*. *Aging Cell* 6: 63-71. doi:10.1111/j.1474-9726.2006.00261.x.
- Burk T (1981) Signaling and Sex in Acalyprate Flies. *The Florida Entomologist* 64: 30-43. doi:10.2307/3494599.
- Burk T (1984) Male-Male Interactions in Caribbean Fruit Flies, *Anastrepha suspensa* (Loew) (Diptera: Tephritidae): Territorial Fights and Signalling Stimulation. *The Florida Entomologist* 67: 542-547. doi:10.2307/3494463.
- C. Economos A, Miquel J, Binnard R & Kessler S (1979) Quantitative analysis of mating behavior in aging male *Drosophila melanogaster*.
- Cajaraville MP, Cancio I, Ibabe A & Orbea A (2003) Peroxisome proliferation as a biomarker in environmental pollution assessment. *Microscopy Research and Technique* 61: 191-202. doi:10.1002/jemt.10329.
- Calla B, Hall B, Hou S & Geib SM (2014) A genomic perspective to assessing quality of mass-reared SIT flies used in Mediterranean fruit fly (*Ceratitis capitata*) eradication in California. *BMC Genomics* 15: 98. doi:10.1186/1471-2164-15-98.
- Cameron P, Hiroi M, Ngai J & Scott K (2010) The molecular basis for water taste in *Drosophila*. *Nature* 465: 91-95. doi:10.1038/nature09011.
- Camin CV, Baker PS, Valenzuela J & Arredondo-Peter R (1992) Separation and spectrophotometric characterization of some fluorescent pigments from *Ceratitis capitata*, W. (diptera: Tephritidae) head capsule. *Insect Biochem Mol Biol* 22: 505-509. doi:https://doi.org/10.1016/0965-1748(92)90147-7.
- Carey JR (1993) *Applied Demography for Biologists with Special Emphasis on Insects*. Oxford University Press.
- Carey JR (1997) What Demographers Can Learn from Fruit Fly Actuarial Models and Biology. *Demography* 34: 17-30.

- Carey JR (2011) Biodemography of the Mediterranean fruit fly: Aging, longevity and adaptation in the wild. *Experimental Gerontology* 46: 404-411.
- Carlsson MA, Diesner M, Schachtner J & Nässel DR (2010) Multiple neuropeptides in the *Drosophila* antennal lobe suggest complex modulatory circuits. *Journal of Comparative Neurology* 518: 3359-3380. doi:10.1002/cne.22405.
- Ceriani MF, Darlington TK, Staknis D, Más P, Petti AA, Weitz CJ & Kay SA (1999) Light-Dependent Sequestration of TIMELESS by CRYPTOCHROME. *Science* 285: 553-556. doi:10.1126/science.285.5427.553.
- Clot F, Grabli D, Cazeneuve C, Roze E, Castelnaud P, Chabrol B, Landrieu P, Nguyen K, Ponsot G, Abada M, Doummar D, Damier P, Gil R, Thobois S, Ward AJ, Hutchinson M, Toutain A, Picard F, Camuzat A, Fedirko E, Sân C, Bouteiller D, LeGuern E, Durr A, Vidailhet M, Brice A & Network tFD (2009) Exhaustive analysis of BH4 and dopamine biosynthesis genes in patients with Dopa-responsive dystonia. *Brain* 132: 1753-1763. doi:10.1093/brain/awp084.
- Colomb J, Reiter L, Blaszkiewicz J, Wessnitzer J & Brembs B (2012) Open Source Tracking and Analysis of Adult *Drosophila* Locomotion in Buridan's Paradigm with and without Visual Targets. *PLoS One* 7: e42247. doi:10.1371/journal.pone.0042247.
- Combes SA & Dudley R (2009) Turbulence-driven instabilities limit insect flight performance. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106: 9105-9108.
- Connolly T (1998) Behaviour, learning and memory, Press at Oxford University Press.
- Cossé AA, Todd JL, Millar JG, Martínez LA & Baker TC (1995) Electroantennographic and coupled gas chromatographic-electroantennographic responses of the mediterranean fruit fly, *Ceratitis capitata*, to male-produced volatiles and mango odor. *Journal of Chemical Ecology* 21: 1823-1836. doi:10.1007/bf02033679.
- Chamy LE, Leclerc V, Caldelari I & Reichhart J-M (2008) Sensing of danger signals and pathogen-associated molecular patterns defines binary signaling pathways upstream of Toll. *Nature Immunology* 9: 1165. doi:10.1038/ni.1643
- <https://www.nature.com/articles/ni.1643#supplementary-information>.
- Chen A, Wilburn P, Hao X & Tully T (2014a) Walking Deficits and Centrophobism in an Alpha-Synuclein Fly Model of Parkinson's Disease.
- Chen AY, Wilburn P, Hao X & Tully T (2014b) Walking deficits and centrophobism in an alpha-synuclein fly model of Parkinson's disease. *Genes Brain Behav* 13: 812-820. doi:10.1111/gbb.12172.
- Chen M-S, Liu S, Wang H, Cheng X, El Bouhssini M & Whitworth RJ (2016) Massive Shift in Gene Expression during Transitions between Developmental Stages of the Gall Midge, *Mayetiola Destructor*. *PLoS One* 11: e0155616-e0155616. doi:10.1371/journal.pone.0155616.
- Chen Y, Cameron S, Chang W-T & Rao Y (2017) Turtle interacts with borderless in regulating glial extension and axon ensheathment. *Molecular Brain* 10: 17. doi:10.1186/s13041-017-0299-6.
- Chen Z, Wang Q & Wang Z (2010) The Amiloride-Sensitive Epithelial Na⁺ Channel PPK28 Is Essential for Gustatory Water Reception. *The Journal of Neuroscience* 30: 6247. doi:10.1523/jneurosci.0627-10.2010.
- Chippendale GM (1978) 1 - The Functions of Carbohydrates in Insect Life Processes: *Biochemistry of Insects* (ed. by M Rockstein) Academic Press, pp. 1-55.
- Chuman T, Landolt PJ, Heath RR & Tumlinson JH (1987) Isolation, identification, and synthesis of male-produced sex pheromone of papaya fruit fly, *Toxotrypana curvicauda* Gerstaecker (Diptera: Tephritidae). *Journal of Chemical Ecology* 13: 1979-1992. doi:10.1007/bf01014680.

- Daubner SC, Le T & Wang S (2011) Tyrosine hydroxylase and regulation of dopamine synthesis. *Archives of biochemistry and biophysics* 508: 1-12. doi:10.1016/j.abb.2010.12.017.
- David J, Cohet Y & Fouillet P (1975) The variability between individuals as a measure of senescence: A study of the number of eggs laid and the percentage of hatched eggs in the case of *Drosophila melanogaster*. *Experimental Gerontology* 10: 17-25. doi:https://doi.org/10.1016/0531-5565(75)90011-X.
- Davis MM, Keefe SL, Primrose DA & Hodgetts RB (2007) A neuropeptide hormone cascade controls the precise onset of post-eclosion cuticular tanning in *Drosophila melanogaster*. *Development* 134: 4395. doi:10.1242/dev.009902.
- Davydov DR (2001) Microsomal monooxygenase in apoptosis: another target for cytochrome C signaling? *Trends in Biochemical Sciences* 26: 155-160. doi:10.1016/s0968-0004(00)01749-7.
- De J, Varma V & Sharma VK (2012) Adult Emergence Rhythm of Fruit Flies *Drosophila melanogaster* under Seminatural Conditions. *Journal of Biological Rhythms* 27: 280-286. doi:10.1177/0748730412448360.
- de Verges J & Nehring V (2016) A critical look at proximate causes of social insect senescence: damage accumulation or hyperfunction? *Curr Opin Insect Sci* 16: 69-75. doi:https://doi.org/10.1016/j.cois.2016.05.003.
- Denlinger DL & Zdarek J (1994) Metamorphosis Behavior of Flies. *Annual Review of Entomology* 39: 243-266. doi:10.1146/annurev.en.39.010194.001331.
- Dierick HA & Greenspan RJ (2006) Molecular analysis of flies selected for aggressive behavior. *Nat Genet* 38: 1023. doi:10.1038/ng1864
- <https://www.nature.com/articles/ng1864#supplementary-information>.
- Dierick HA & Greenspan RJ (2007) Serotonin and neuropeptide F have opposite modulatory effects on fly aggression. *Nat Genet* 39: 678. doi:10.1038/ng2029
- <https://www.nature.com/articles/ng2029#supplementary-information>.
- Dodson G (1986) Lek Mating System and Large Male Aggressive Advantage in a Gall-forming Tephritid Fly (Diptera: Tephritidae). *Ethology* 72: 99-108. doi:10.1111/j.1439-0310.1986.tb00610.x.
- Dollar G, Gombos R, Barnett AA, Sanchez Hernandez D, Maung SMT, Mihály J & Jenny A (2016) Unique and Overlapping Functions of Formins Frl and DAAM During Ommatidial Rotation and Neuronal Development in *Drosophila*. *Genetics* 202: 1135-1151. doi:10.1534/genetics.115.181438.
- Donlea JM, Pimentel D, Talbot CB, Kempf A, Omoto JJ, Hartenstein V & Miesenböck G (2018) Recurrent Circuitry for Balancing Sleep Need and Sleep. *Neuron* 97: 378-389.e374. doi:10.1016/j.neuron.2017.12.016.
- Draper I, Kurshan PT, McBride E, Jackson FR & Kopin AS (2007) Locomotor activity is regulated by D2-like receptors in *Drosophila*: An anatomic and functional analysis. *Developmental Neurobiology* 67: 378-393. doi:10.1002/dneu.20355.
- Dubnau J (2014) Behavioral Genetics of the Fly (*Drosophila Melanogaster*). Cold Spring Harbour Laboratory.
- Dunn OJ (1964) Multiple Comparisons Using Rank Sums. *Technometrics* 6: 241-252. doi:10.1080/00401706.1964.10490181.
- Ebbs ML & Amrein H (2007) Taste and pheromone perception in the fruit fly *Drosophila melanogaster*. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology* 454: 735-747. doi:10.1007/s00424-007-0246-y.
- Edwards AC, Zwartz L, Yamamoto A, Callaerts P & Mackay TFC (2009) Mutations in many genes affect aggressive behavior in *Drosophila melanogaster*. *BMC Biology* 7: 29-29. doi:10.1186/1741-7007-7-29.

- Elbein AD, Pan YT, Pastuszak I & Carroll D (2003) New insights on trehalose: a multifunctional molecule. *Glycobiology* 13: 17R-27R. doi:10.1093/glycob/cwg047.
- Featherstone DE, Rushton E & Broadie K (2002) Developmental regulation of glutamate receptor field size by nonvesicular glutamate release. *Nature neuroscience* 5: 141-146. doi:10.1038/nn789.
- Félix JT, Magariños M & Díaz-Benjumea FJ (2007) Nab controls the activity of the zinc-finger transcription factors Squeeze and Rotund in *Drosophila* development. *Development* 134: 1845-1852. doi:10.1242/dev.003830.
- Fernández MP & Kravitz EA (2013) Aggression and courtship in *Drosophila*: pheromonal communication and sex recognition. *Journal of comparative physiology. A, Neuroethology, sensory, neural, and behavioral physiology* 199: 1065-1076. doi:10.1007/s00359-013-0851-5.
- Feyereisen R (1999) INSECT P450 ENZYMES. *Annual Review of Entomology* 44: 507-533. doi:10.1146/annurev.ento.44.1.507.
- Field SA, Kaspi R & Yuval B (2009) Why do calling medflies (Diptera: Tephritidae) cluster? Assessing the empirical evidence for models of medfly lek evolution.
- Flath RA, Jang EB, Light DM, Mon TR, Carvalho L, Binder RG & John JO (1993) Volatile pheromonal emissions from the male Mediterranean fruit fly: Effects of fly age and time of day. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 41: 830-837. doi:10.1021/jf00029a029.
- Flatt T & Partridge L (2018) Horizons in the evolution of aging. *BMC Biology* 16: 93. doi:10.1186/s12915-018-0562-z.
- Francisovich AL, Mortimer ADV, Freeman AA, Gu J & Sanyal S (2008) Overexpression Screen in *Drosophila* Identifies Neuronal Roles of GSK-3 β shaggy as a Regulator of AP-1-Dependent Developmental Plasticity. *Genetics* 180: 2057-2071. doi:10.1534/genetics.107.085555.
- Freeman MR, Dobritsa A, Gaines P, Segraves WA & Carlson JR (1999) The dare gene: steroid hormone production, olfactory behavior, and neural degeneration in *Drosophila*. *Development* 126: 4591.
- Frew JGH (1929) Studies in the Metabolism of Insect Metamorphosis. *Journal of Experimental Biology* 6: 205.
- Gaitanidis A, Dimitriadou A, Dowse H, Sanyal S, Duch C & Consoulas C (2019) Longitudinal assessment of health-span and pre-death morbidity in wild type *Drosophila*. *Aging* (Albany NY). doi:10.18632/aging.101880.
- Gan Q, Chepelev I, Wei G, Tarayrah L, Cui K, Zhao K & Chen X (2010) Dynamic regulation of alternative splicing and chromatin structure in *Drosophila* gonads revealed by RNA-seq. *Cell Research* 20: 763. doi:10.1038/cr.2010.64
- <https://www.nature.com/articles/cr201064#supplementary-information>.
- Gao L, Wang L, Yang X, Wang Y, Liu Z, Xu B & Guo X (2019) Role of a serine protease gene (AccSp1) from *Apis cerana cerana* in abiotic stress responses and innate immunity. *Cell Stress and Chaperones* 24: 29-43. doi:10.1007/s12192-018-0934-x.
- Garber M, Grabherr MG, Guttman M & Trapnell C (2011) Computational methods for transcriptome annotation and quantification using RNA-seq. *Nat Methods* 8: 469. doi:10.1038/nmeth.1613
- <https://www.nature.com/articles/nmeth.1613#supplementary-information>.
- Gargano JW, Martin I, Bhandari P & Grotewiel MS (2005) Rapid iterative negative geotaxis (RING): a new method for assessing age-related locomotor decline in *Drosophila*. *Exp Gerontol* 40: 386-395. doi:S0531-5565(05)00034-3 [pii]
- 10.1016/j.exger.2005.02.005.

- Gaskin T, Futerman P & Chapman T (2002) Increased density and male–male interactions reduce male longevity in the medfly, *Ceratitis capitata*. *Animal Behaviour* 63: 121-129.
- Gems D & de la Guardia Y (2013) Alternative Perspectives on Aging in *Caenorhabditis elegans*: Reactive Oxygen Species or Hyperfunction? *Antioxid Redox Signal* 19: 321-329. doi:10.1089/ars.2012.4840.
- Gilestro GF (2012) Video tracking and analysis of sleep in *Drosophila melanogaster*. *Nature Protocols* 7: 995. doi:10.1038/nprot.2012.041
- <https://www.nature.com/articles/nprot.2012.041#supplementary-information>.
- Goda T, Tang X, Umezaki Y, Chu ML, Kunst M, Nitabach MN & Hamada FN (2016) *Drosophila* DH31 Neuropeptide and PDF Receptor Regulate Night-Onset Temperature Preference. *The Journal of Neuroscience* 36: 11739. doi:10.1523/jneurosci.0964-16.2016.
- Gomez-Marin A, Partoune N, Stephens GJ & Louis M (2012) Automated Tracking of Animal Posture and Movement during Exploration and Sensory Orientation Behaviors. *PLoS One* 7: e41642. doi:10.1371/journal.pone.0041642.
- Gomulski LM, Dimopoulos G, Xi Z, Soares MB, Bonaldo MF, Malacrida AR & Gasperi G (2008) Gene discovery in an invasive tephritid model pest species, the Mediterranean fruit fly, *Ceratitis capitata*. *BMC Genomics* 9: 243. doi:10.1186/1471-2164-9-243.
- Gonçalves GB, Silva CE, Santos JCGD, Santos ESD, Nascimento RRD, Silva ELD, Mendonça ADL, Freitas MDRTD & Sant'Ana AEG (2006) COMPARISON OF THE VOLATILE COMPONENTS RELEASED BY CALLING MALES OF CERATITIS CAPITATA (DIPTERA: TEPHRITIDAE) WITH THOSE EXTRACTABLE FROM THE SALIVARY GLANDS. *Florida Entomologist* 89: 375-379, 375.
- Goubault M & Decuignière M (2012) Previous Experience and Contest Outcome: Winner Effects Persist in Absence of Evident Loser Effects in a Parasitoid Wasp. *The American Naturalist* 180: 364-371. doi:10.1086/667192.
- Graveley BR, Brooks AN, Carlson JW, Duff MO, Landolin JM, Yang L, Artieri CG, van Baren MJ, Boley N, Booth BW, Brown JB, Cherbas L, Davis CA, Dobin A, Li R, Lin W, Malone JH, Mattiuzzo NR, Miller D, Sturgill D, Tuch BB, Zaleski C, Zhang D, Blanchette M, Dudoit S, Eads B, Green RE, Hammonds A, Jiang L, Kapranov P, Langton L, Perrimon N, Sandler JE, Wan KH, Willingham A, Zhang Y, Zou Y, Andrews J, Bickel PJ, Brenner SE, Brent MR, Cherbas P, Gingeras TR, Hoskins RA, Kaufman TC, Oliver B & Celniker SE (2011) The developmental transcriptome of *Drosophila melanogaster*. *Nature* 471: 473-479. doi:10.1038/nature09715.
- Graves JL & Mueller LD (1993) Population density effects on longevity. *Genetica* 91: 99-109. doi:10.1007/bf01435991.
- Grillner S (2006) Biological Pattern Generation: The Cellular and Computational Logic of Networks in Motion. *Neuron* 52: 751-766. doi:10.1016/j.neuron.2006.11.008.
- Gross C & Hen R (2004) The developmental origins of anxiety. *Nature Reviews Neuroscience* 5: 545. doi:10.1038/nrn1429.
- Grotewiel MS, Martin I, Bhandari P & Cook-Wiens E (2005) Functional senescence in *Drosophila melanogaster*. *Ageing Res Rev* 4: 372-397. doi:S1568-1637(05)00014-0 [pii] 10.1016/j.arr.2005.04.001.
- Gullan PJ & Cranston PS (2014) *The Insects: An Outline of Entomology*, 5th Edition. Wiley-Blackwell.
- Gutierrez H, Hale VA, Dolcet X & Davies A (2005) NF-κB signalling regulates the growth of neural processes in the developing PNS and CNS. *Development* 132: 1713-1726. doi:10.1242/dev.01702.
- Ha TS & Smith DP (2006) A Pheromone Receptor Mediates 11-cis-Vaccenyl Acetate-Induced Responses in *Drosophila*. *The Journal of Neuroscience* 26: 8727. doi:10.1523/jneurosci.0876-06.2006.

- Hahn DA & Denlinger DL (2010) Energetics of Insect Diapause. *Annual Review of Entomology* 56: 103-121. doi:10.1146/annurev-ento-112408-085436.
- Halliday T (1983) The study of mate choice. In: Bateson P (ed) *Mate choice*. Cambridge University.
- Halliday TR & Verrell PA (1988) Body Size and Age in Amphibians and Reptiles. *Journal of Herpetology* 22: 253-265. doi:10.2307/1564148.
- He P, Zhang Y-F, Hong D-Y, Wang J, Wang X-L, Zuo L-H, Tang X-F, Xu W-M & He M (2017) A reference gene set for sex pheromone biosynthesis and degradation genes from the diamondback moth, *Plutella xylostella*, based on genome and transcriptome digital gene expression analyses. *BMC Genomics* 18: 219. doi:10.1186/s12864-017-3592-y.
- Heath RR, Landolt PJ, Tumlinson JH, Chambers DL, Murphy RE, Doolittle RE, Dueben BD, Sivinski J & Calkins CO (1991) Analysis, synthesis, formulation, and field testing of three major components of male mediterranean fruit fly pheromone. *Journal of Chemical Ecology* 17: 1925-1940. doi:10.1007/bf00993739.
- Heckscher ES, Fetter RD, Marek KW, Albin SD & Davis GW (2007) NF-kappaB, IkappaB, and IRAK control glutamate receptor density at the *Drosophila* NMJ. *Neuron* 55: 859-873. doi:10.1016/j.neuron.2007.08.005.
- Heiming R & Sachser N (2010) Consequences of Serotonin Transporter Genotype and Early Adversity on Behavioral Profile – Pathology or Adaptation? *Frontiers in Neuroscience* 4. doi:10.3389/fnins.2010.00187.
- Heinze J & Schrepf A (2008) Aging and Reproduction in Social Insects – A Mini-Review. *Gerontology* 54: 160-167. doi:10.1159/000122472.
- Helfand SL & Rogina B (2003) Genetics of aging in the fruit fly, *Drosophila melanogaster*. *Annual Review of Genetics* 37: 329-348. doi:10.1146/annurev.genet.37.040103.095211.
- Hengst U, Albrecht H, Hess D & Monard D (2001) The phosphatidylethanolamine-binding protein is the prototype of a novel family of serine protease inhibitors. *The Journal of Biological Chemistry* 276: 535-540. doi:10.1074/jbc.m002524200.
- Herskovits AZ & Guarente L (2014) SIRT1 in Neurodevelopment and Brain Senescence. *Neuron* 81: 471-483. doi:https://doi.org/10.1016/j.neuron.2014.01.028.
- Heyn H (2014) A symbiotic liaison between the genetic and epigenetic code. *Front Genet* 5. doi:10.3389/fgene.2014.00113.
- Higashiyama H, Hirose F, Yamaguchi M, Inoue YH, Fujikake N, Matsukage A & Kakizuka A (2002) Identification of ter94, *Drosophila* VCP, as a modulator of polyglutamine-induced neurodegeneration. *Cell Death & Differentiation* 9: 264-273. doi:10.1038/sj.cdd.4400955.
- Hill DS (1975) *Agricultural Insect Pests of the Tropics and their Control*.
- Hoffmann AA (1987) A laboratory study of male territoriality in the sibling species *Drosophila melanogaster* and *D. simulans*. *Animal Behaviour* 35: 807-818. doi:https://doi.org/10.1016/S0003-3472(87)80117-3.
- Höglund J & Alatalo RV (2014) *Leks*. Princeton University Press.
- Hong S-H, Lee K-S, Kwak S-J, Kim A-K, Bai H, Jung M-S, Kwon OY, Song W-J, Tatar M & Yu K (2012) Minibrain/Dyrk1a Regulates Food Intake through the Sir2-FOXO-sNPF/NPY Pathway in *Drosophila* and Mammals. *PLOS Genetics* 8: e1002857. doi:10.1371/journal.pgen.1002857.
- Hoshizaki DK (2005) *Fat-Cell Development*.
- Howard DR, Lee N, Hall CL & Mason AC (2011) Are centrally displaying males always the centre of female attention? Acoustic display position and female choice in a lek mating subterranean insect. *Ethology* 117: 199-207.
- Hsu Y, Earley RL & Wolf LL (2006) Modulation of aggressive behaviour by fighting experience: mechanisms and contest outcomes. *Biological Reviews* 81: 33-74.

- Hugo LE, Kay BH, Eaglesham GK, Holling N & Ryan PA (2006) Investigation of cuticular hydrocarbons for determining the age and survivorship of australasian mosquitoes. *Am J Trop Med Hyg* 74: 462-474. doi:74/3/462 [pii].
- Hugo LE, Monkman J, Dave KA, Wockner LF, Birrell GW, Norris EL, Kienzle VJ, Sikulu MT, Ryan PA, Gorman JJ & Kay BH (2013) Proteomic Biomarkers for Ageing the Mosquito *Aedes aegypti* to Determine Risk of Pathogen Transmission. *PLoS One* 8: e58656. doi:10.1371/journal.pone.0058656.
- Husson F, Josse J, Lê S & Mazet J (2014) FactoMineR: Multivariate Exploratory Data Analysis and Data Mining with R.
- Hyzer WG (1962) Flight behavior of a fly alighting on a ceiling. *Science* 137: 609-610.
- Iwasakiandast M, Delago A, Nishino H & Aonuma H (2006) Effects of Previous Experience on the Agonistic Behaviour of Male Crickets, *Gryllus bimaculatus*. *BIOONE*.
- Jang EB (1995) Effects of mating and accessory gland injections on olfactory-mediated behavior in the female mediterranean fruit fly, *Ceratitis capitata*. *Journal of Insect Physiology* 41: 705-710. doi:https://doi.org/10.1016/0022-1910(95)00015-M.
- Jang EB, Light DM, Flath RA, Nagata JT & Mon TR (1989) Electroantennogram responses of the Mediterranean fruit fly, *Ceratitis capitata* to identified volatile constituents from calling males. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 50: 7-19. doi:10.1111/j.1570-7458.1989.tb02307.x.
- Johard HAD, Enell LE, Gustafsson E, Trifilieff P, Veenstra JA & Nässel DR (2008) Intrinsic neurons of *Drosophila* mushroom bodies express short neuropeptide F: Relations to extrinsic neurons expressing different neurotransmitters. *Journal of Comparative Neurology* 507: 1479-1496. doi:10.1002/cne.21636.
- Johnston RN, Shaw C, Brennan GP, Maule AG & Halton DW (1995) Localisation, quantitation, and characterisation of neuropeptide F- and FMRFamide-immunoreactive peptides in turbellarians and a monogenean: A comparative study. *Journal of Comparative Neurology* 357: 76-84. doi:10.1002/cne.903570108.
- Jones MA & Grotewiel M (2011) *Drosophila* as a model for age-related impairment in locomotor and other behaviors. *Experimental Gerontology* 46: 320-325. doi:10.1016/j.exger.2010.08.012.
- Joshi A & Mueller LD (1997) Adult crowding effects on longevity in *Drosophila melanogaster*: Increase in age-independent mortality. *Current Science* 72: 255-260.
- Kahsai L & Winther ÅME (2011) Chemical neuroanatomy of the *Drosophila* central complex: Distribution of multiple neuropeptides in relation to neurotransmitters. *Journal of Comparative Neurology* 519: 290-315. doi:10.1002/cne.22520.
- Kapranas A, Snart CJP, Williams H, Hardy ICW & Barrett DA (2016) Metabolomics of aging assessed in individual parasitoid wasps. *Sci Rep* 6: 34848. doi:10.1038/srep34848
- <https://www.nature.com/articles/srep34848#supplementary-information>.
- Kapur M, Monaghan CE & Ackerman SL (2017) Regulation of mRNA Translation in Neurons, A Matter of Life and Death. *Neuron* 96: 616-637. doi:10.1016/j.neuron.2017.09.057.
- Karlson P & Lüscher M (1959) 'Pheromones': a New Term for a Class of Biologically Active Substances. *Nature* 183: 55-56. doi:10.1038/183055a0.
- Kaspi R & Yuval B (1999) Mediterranean fruit fly leks: factors affecting male location. *Functional Ecology* 13: 539-545.
- Kimura K-i, Kodama A, Hayasaka Y & Ohta T (2004) Activation of the cAMP/PKA signaling pathway is required for post-ecdysial cell death in wing epidermal cells of *Drosophila melanogaster*. *Development* 131: 1597. doi:10.1242/dev.01049.

- King-Jones K, Horner MA, Lam G & Thummel CS (2006) The DHR96 nuclear receptor regulates xenobiotic responses in *Drosophila*. *Cell Metabolism* 4: 37-48.
doi:<https://doi.org/10.1016/j.cmet.2006.06.006>.
- Klowden MJ (2013) Chapter 6 - Metabolic Systems: Physiological Systems in Insects (Third Edition) (ed. by MJ Klowden) Academic Press, San Diego, pp. 305-364.
- Knight JA, Anderson S & Rawle JM (1972) Chemical Basis of the Sulfo-phospho-vanillin Reaction for Estimating Total Serum Lipids. *Clinical Chemistry* 18: 199.
- Kolodziejczyk A, Sun X, Meinertzhagen IA & Nässel DR (2008) Glutamate, GABA and Acetylcholine Signaling Components in the Lamina of the *Drosophila* Visual System. *PLoS One* 3: e2110. doi:10.1371/journal.pone.0002110.
- Komiyama T & Luo L (2007) Intrinsic Control of Precise Dendritic Targeting by an Ensemble of Transcription Factors. *Current Biology* 17: 278-285. doi:10.1016/j.cub.2006.11.067.
- Kongton K, McCall K & Phongdara A (2014) Identification of gamma-interferon-inducible lysosomal thiol reductase (GILT) homologues in the fruit fly *Drosophila melanogaster*. *Developmental & Comparative Immunology* 44: 389-396.
doi:<https://doi.org/10.1016/j.dci.2014.01.007>.
- Kounatidis I & Chtarbanova S (2018) Role of Glial Immunity in Lifespan Determination: A *Drosophila* Perspective. *Frontiers in Immunology* 9. doi:10.3389/fimmu.2018.01362.
- Kravitz EA & Fernandez MdP (2015) Aggression in *Drosophila*. *Behavioral Neuroscience* 129: 549-563. doi:10.1037/bne0000089.
- Kravitz EA & Huber R (2003) Aggression in invertebrates. *Current Opinion in Neurobiology* 13: 736-743. doi:<https://doi.org/10.1016/j.conb.2003.10.003>.
- Krisman CR (1962) A method for the colorimetric estimation of glycogen with iodine. *Anal Biochem* 4: 17-23.
- Kruskal WH & Wallis WA (1952) Use of Ranks in One-Criterion Variance Analysis. *Journal of the American Statistical Association* 47: 583-621. doi:10.2307/2280779.
- Kunst M, Hughes Michael E, Raccuglia D, Felix M, Li M, Barnett G, Duah J & Nitabach Michael N (2014) Calcitonin Gene-Related Peptide Neurons Mediate Sleep-Specific Circadian Output in *Drosophila*. *Current Biology* 24: 2652-2664.
doi:<https://doi.org/10.1016/j.cub.2014.09.077>.
- Lank DB, Smith CM, Hanotte O, Burke T & Cooke F (1995) Genetic polymorphism for alternative mating behaviour in lekking male ruff *Philomachus pugnax*. *Nature* 378: 59-62. doi:10.1038/378059a0.
- Larter NK, Sun JS & Carlson JR (2016) Organization and function of *Drosophila* odorant binding proteins. *Elife* 5. doi:10.7554/eLife.20242.
- Le Bourg E (1999) A review of the effects of microgravity and of hypergravity on aging and longevity. *Experimental Gerontology* 34: 319-336.
- Lee K-S, Kwon OY, Lee JH, Kwon K, Min K-J, Jung S-A, Kim A-K, You K-H, Tatar M & Yu K (2008) *Drosophila* short neuropeptide F signalling regulates growth by ERK-mediated insulin signalling. *Nature Cell Biology* 10: 468. doi:10.1038/ncb1710
<https://www.nature.com/articles/ncb1710#supplementary-information>.
- Leffelaar D & Grigliatti TA (1983) A mutation in *Drosophila* that appears to accelerate aging. *Developmental Genetics* 4: 199-210. doi:10.1002/dvg.1020040306.
- Ligoxygakis P, Pelte N, Hoffmann JA & Reichhart J-M (2002) Activation of *Drosophila* Toll During Fungal Infection by a Blood Serine Protease. *Science* 297: 114.
doi:10.1126/science.1072391.
- Linford NJ, Kuo T-H, Chan TP & Pletcher SD (2011) Sensory Perception and Aging in Model Systems: From the Outside In. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 27: 759-785. doi:10.1146/annurev-cellbio-092910-154240.

- Liu P, Sane SP, Mongeau J-M, Zhao J & Cheng B (2019) Flies land upside down on a ceiling using rapid visually mediated rotational maneuvers. *Science Advances* 5: eaax1877. doi:10.1126/sciadv.aax1877.
- Liu T, Darteville L, Yuan C, Wei H, Wang Y, Ferveur J-F & Guo A (2008a) Increased dopamine level enhances male–male courtship in *Drosophila*. *Journal of Neuroscience* 28: 5539-5546.
- Liu Z, Wang X, Yu Y, Li X, Wang T, Jiang H, Ren Q, Jiao Y, Sawa A, Moran T, Ross CA, Montell C & Smith WW (2008b) A *Drosophila* model for LRRK2-linked parkinsonism. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105: 2693-2698. doi:10.1073/pnas.0708452105.
- Long H, Ou Y, Rao Y & van Meyel DJ (2009) Dendrite branching and self-avoidance are controlled by Turtle, a conserved IgSF protein in *Drosophila*. *Development* 136: 3475-3484. doi:10.1242/dev.040220.
- Lorenz K (1963) *On Aggression: by Ba World*, New York.
- Lowe SA, Usowicz MM & Hodge JLL (2019) Neuronal overexpression of Alzheimer's disease and Down's syndrome associated DYRK1A/minibrain gene alters motor decline, neurodegeneration and synaptic plasticity in *Drosophila*. *Neurobiol Dis* 125: 107-114. doi:https://doi.org/10.1016/j.nbd.2019.01.017.
- Luo C-W, Dewey EM, Sudo S, Ewer J, Hsu SY, Honegger H-W & Hsueh AJW (2005) Bursicon, the insect cuticle-hardening hormone, is a heterodimeric cystine knot protein that activates G protein-coupled receptor LGR2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102: 2820. doi:10.1073/pnas.0409916102.
- Lushchak OV, Karaman HS, Kozeretska IA, Koliada AK, Zabuga OG, Pizaruk AV, Koshel NM, Mechova LV, Inomistova MV, Khranovska NM & Vaiserman AM (2019) Larval crowding results in hormesis-like effects on longevity in *Drosophila*: timing of eclosion as a model. *Biogerontology* 20: 191-201. doi:10.1007/s10522-018-9786-0.
- Lloyd L (1867) *The Game Birds and Wild Fowl of Sweden and Norway: With an Account of the Seals and Salt-water Fishes of Those Countries*. F. Warne and Company.
- Madariaga M, Ribera. (1970) Biochemistry of the development of the insect *Ceratitis capitata*: evolution of fatty acid composition of different lipid classes. *Comp. Bioch. Phys.* 36: 271-278.
- Maher CA, Kumar-Sinha C, Cao X, Kalyana-Sundaram S, Han B, Jing X, Sam L, Barrette T, Palanisamy N & Chinnaiyan AM (2009) Transcriptome sequencing to detect gene fusions in cancer. *Nature* 458: 97. doi:10.1038/nature07638
- <https://www.nature.com/articles/nature07638#supplementary-information>.
- Mancini E (2016) Identificación y caracterización de eventos de splicing alternativo en *Arabidopsis thaliana* utilizando herramientas de transcriptómica de alto rendimiento., Vol. Doctora: Laboratorio de genómica comparativa del desarrollo vegetal. Laboratorio de biología de sistemas integrativa. Instituto de Investigaciones Bioquímicas de Buenos Aires (IIBBA). Fundación Instituto Leloir (ed. Universidad de Buenos Aires, Biblioteca Central Dr. Luis F. Leloir, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires.
- Mao C-X, Xiong Y, Xiong Z, Wang Q, Zhang YQ & Jin S (2014) Microtubule-severing protein Katanin regulates neuromuscular junction development and dendritic elaboration in *Drosophila*. *Development* 141: 1064-1074. doi:10.1242/dev.097774.
- Markow T (1996) Evolution of *Drosophila* mating systems.
- Markowska AL & Breckler SJ (1999) Behavioral Biomarkers of Aging: Illustration of a Multivariate Approach for Detecting Age-Related Behavioral Changes. *The Journals of Gerontology: Series A* 54: B549-B566. doi:10.1093/gerona/54.12.B549.

- Marrone AK, Kucherenko MM, Rishko VM & Shcherbata HR (2011) New dystrophin/dystroglycan interactors control neuron behavior in *Drosophila* eye. *BMC Neurosci* 12: 93. doi:10.1186/1471-2202-12-93.
- McBride G (1971) Theories of the Role of Animal Spacing: Flight, Fight and Social Distance: Behavior And Environment, The Use of Space by Animals and Men. (ed. by AH Esser) Plenum Press • New York-London • 1971, Proceedings of an International Symposium held at the 1968 meeting of the American Association for the Advancement of Science in Dallas, Texas, pp. 53-68.
- McGurk L, Berson A & Bonini NM (2015) *Drosophila* as an *In Vivo* Model for Human Neurodegenerative Disease. *Genetics* 201: 377. doi:10.1534/genetics.115.179457.
- Meffert MK, Chang JM, Wiltgen BJ, Faselow MS & Baltimore D (2003) NF- κ B functions in synaptic signaling and behavior. *Nature neuroscience* 6: 1072-1078. doi:10.1038/nn1110.
- Merkey AB, Wong CK, Hoshizaki DK & Gibbs AG (2011) Energetics of metamorphosis in *Drosophila melanogaster*. *Journal of Insect Physiology* 57: 1437-1445. doi:https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2011.07.013.
- Mertens I, Vandingenen A, Johnson EC, Shafer OT, Li W, Trigg JS, De Loof A, Schoofs L & Taghert PH (2005) PDF Receptor Signaling in *Drosophila* Contributes to Both Circadian and Geotactic Behaviors. *Neuron* 48: 213-219. doi:10.1016/j.neuron.2005.09.009.
- Miller G (2010) The Seductive Allure of Behavioral Epigenetics. *Science* 329: 24. doi:10.1126/science.329.5987.24.
- Minois N & Le Bourg É (1999) Resistance to stress as a function of age in *Drosophila melanogaster* living in hypergravity. *Mechanisms of Ageing and Development* 109: 53-64. doi:https://doi.org/10.1016/S0047-6374(99)00025-1.
- Miquel J, Lundgren PR, Bensch KG & Atlan H (1976) Effects of temperature on the life span, vitality and fine structure of *Drosophila melanogaster*. *Mechanisms of Ageing and Development* 5: 347-370. doi:https://doi.org/10.1016/0047-6374(76)90034-8.
- Miyan JA (1989) The thoracic mechanism for eclosion and digging during the extrication behaviour of Diptera. *Physiological Entomology* 14: 309-317. doi:10.1111/j.1365-3032.1989.tb01098.x.
- Miyatake T, Tabuchi K, Sasaki K, Okada K, Katayama K & Moriya S (2008) Pleiotropic antipredator strategies, fleeing and feigning death, correlated with dopamine levels in *Tribolium castaneum*. *Animal Behaviour* 75: 113-121. doi:https://doi.org/10.1016/j.anbehav.2007.04.019.
- Mohan RD, Dialynas G, Weake VM, Liu J, Martin-Brown S, Florens L, Washburn MP, Workman JL & Abmayr SM (2014) Loss of *Drosophila* Ataxin-7, a SAGA subunit, reduces H2B ubiquitination and leads to neural and retinal degeneration. *Genes Dev* 28: 259-272. doi:10.1101/gad.225151.113.
- Monnier V, Llorens JV & Navarro JA (2018) Impact of *Drosophila* Models in the Study and Treatment of Friedreich's Ataxia. *Int J Mol Sci* 19: 1989. doi:10.3390/ijms19071989.
- Moore AJ, Brodie Iii ED & Wolf JB (1997) Interacting phenotypes and the evolutionary process: I. Direct and indirect genetic effects of social interactions. *Evolution* 51: 1352-1362. doi:10.1111/j.1558-5646.1997.tb01458.x.
- Mortazavi A, Williams BA, McCue K, Schaeffer L & Wold B (2008) Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq. *Nat Methods* 5: 621. doi:10.1038/nmeth.1226
- <https://www.nature.com/articles/nmeth.1226#supplementary-information>.
- Müller C & Tremmel M (2012) Insect personality depends on environmental conditions. *Behavioral Ecology* 24: 386-392. doi:10.1093/beheco/ars175.

- Mulligan CJ (2018) Insights from epigenetic studies on human health and evolution. *Current Opinion in Genetics & Development* 53: 36-42. doi:<https://doi.org/10.1016/j.gde.2018.06.008>.
- Münch D, Amdam GV & Wolschin F (2008) Ageing in a eusocial insect: molecular and physiological characteristics of life span plasticity in the honey bee. *Functional Ecology* 22: 407-421. doi:[10.1111/j.1365-2435.2008.01419.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2435.2008.01419.x).
- Murthy M & Ram JL (2015) Invertebrates as model organisms for research on aging biology. *Invertebrate Reproduction & Development* 59: 1-4. doi:[10.1080/07924259.2014.970002](https://doi.org/10.1080/07924259.2014.970002).
- Myers EM (2003) The Circadian Control of Eclosion. *Chronobiology International* 20: 775-794. doi:[10.1081/cbi-120024214](https://doi.org/10.1081/cbi-120024214).
- Nagalakshmi U, Wang Z, Waern K, Shou C, Raha D, Gerstein M & Snyder M (2008) The Transcriptional Landscape of the Yeast Genome Defined by RNA Sequencing. *Science* 320: 1344. doi:[10.1126/science.1158441](https://doi.org/10.1126/science.1158441).
- Nash WJ, Mohorianu I & Chapman T (2018) Mate choice and gene expression signatures associated with nutritional adaptation in the medfly (Ceratitis capitata). bioRxiv: 362210. doi:[10.1101/362210](https://doi.org/10.1101/362210).
- Nässel DR (2018) Substrates for Neuronal Cotransmission With Neuropeptides and Small Molecule Neurotransmitters in *Drosophila*. *Frontiers in Cellular Neuroscience* 12. doi:[10.3389/fncel.2018.00083](https://doi.org/10.3389/fncel.2018.00083).
- Nässel DR, Enell LE, Santos JG, Wegener C & Johard HAD (2008) A large population of diverse neurons in the *Drosophila* central nervous system expresses short neuropeptide F, suggesting multiple distributed peptide functions. *BMC Neuroscience* 9: 90. doi:[10.1186/1471-2202-9-90](https://doi.org/10.1186/1471-2202-9-90).
- Nation (2002) *Insect Physiology and Biochemistry*. CRC Press, Boca Raton.
- Navarro JA, Ohmann E, Sanchez D, Botella JA, Liebisch G, Moltó MD, Ganfornina MD, Schmitz G & Schneuwly S (2010) Altered lipid metabolism in a *Drosophila* model of Friedreich's ataxia. *Human Molecular Genetics* 19: 2828-2840. doi:[10.1093/hmg/ddq183](https://doi.org/10.1093/hmg/ddq183).
- Nestel D, Papadopoulos NT, Liedo P, Gonzales-Ceron L & Carey JR (2005) Trends in lipid and protein contents during medfly aging: an harmonic path to death. *Arch Insect Biochem Physiol* 60: 130-139. doi:[10.1002/arch.20091](https://doi.org/10.1002/arch.20091).
- Nghiem D, Gibbs AG, Rose MR & Bradley TJ (2000) Postponed aging and desiccation resistance in *Drosophila melanogaster*. *Experimental Gerontology* 35: 957-969. doi:[https://doi.org/10.1016/S0531-5565\(00\)00163-7](https://doi.org/10.1016/S0531-5565(00)00163-7).
- Nickel W (2003) The mystery of nonclassical protein secretion. A current view on cargo proteins and potential export routes. *Eur J Biochem* 270: 2109-2119.
- Nikhil KL, Abhilash L & Sharma VK (2016) Molecular Correlates of Circadian Clocks in Fruit Fly *Drosophila melanogaster* Populations Exhibiting early and late Emergence Chronotypes. *Journal of Biological Rhythms* 31: 125-141. doi:[10.1177/0748730415627933](https://doi.org/10.1177/0748730415627933).
- Nishida R, Shelly TE, Whittier TS & Kaneshiro KY (2000) α -Copaene, A Potential Rendezvous Cue for the Mediterranean Fruit Fly, *Ceratitidis Capitata*? *Journal of Chemical Ecology* 26: 87-100. doi:[10.1023/a:1005489411397](https://doi.org/10.1023/a:1005489411397).
- Njålsson R (2005) Glutathione synthetase deficiency. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS* 62: 1938-1945. doi:[10.1007/s00018-005-5163-7](https://doi.org/10.1007/s00018-005-5163-7).
- Noldus LPJJ, Spink AJ & Tegelenbosch RAJ (2001) EthoVision: A versatile video tracking system for automation of behavioral experiments. *Behavior Research Methods, Instruments, & Computers* 33: 398-414. doi:[10.3758/bf03195394](https://doi.org/10.3758/bf03195394).
- Novoseltsev VN, Arking R, Carey JR, Novoseltseva JA & Yashin AI (2005) Individual fecundity and senescence in *Drosophila* and medfly. *The journals of gerontology. Series A, Biological sciences and medical sciences* 60: 953-962. doi:[10.1093/gerona/60.8.953](https://doi.org/10.1093/gerona/60.8.953).

- Orso G, Martinuzzi A, Rossetto MG, Sartori E, Feany M & Daga A (2005) Disease-related phenotypes in a *Drosophila* model of hereditary spastic paraplegia are ameliorated by treatment with vinblastine. *J Clin Invest* 115: 3026-3034. doi:10.1172/JCI24694.
- Overend G, Cabrero P, Guo AX, Sebastian S, Cundall M, Armstrong H, Mertens I, Schoofs L, Dow JAT & Davies S-A (2012) The receptor guanylate cyclase *Gyc76C* and a peptide ligand, *NPLP1-VQQ*, modulate the innate immune IMD pathway in response to salt stress. *Peptides* 34: 209-218. doi:https://doi.org/10.1016/j.peptides.2011.08.019.
- Papadopoulos NT, Carey JR, Katsoyannos BI, Kouloussis NA, Muller HG & Liu X (2002) Supine behaviour predicts the time to death in male Mediterranean fruitflies (*Ceratitis capitata*). *Proc Biol Sci* 269: 1633-1637. doi:10.1098/rspb.2002.2078.
- Papanicolaou A, Schetelig MF, Arensburger P, Atkinson PW, Benoit JB, Bourtzis K, Castanera P, Cavanaugh JP, Chao H, Childers C, Curril I, Dinh H, Doddapaneni H, Dolan A, Dugan S, Friedrich M, Gasperi G, Geib S, Georgakilas G, Gibbs RA, Giers SD, Gomulski LM, Gonzalez-Guzman M, Guillem-Amat A, Han Y, Hatzigeorgiou AG, Hernandez-Crespo P, Hughes DS, Jones JW, Karagkouni D, Koskinioti P, Lee SL, Malacrida AR, Manni M, Mathiopoulos K, Meccariello A, Munoz-Torres M, Murali SC, Murphy TD, Muzny DM, Oberhofer G, Ortego F, Paraskevopoulou MD, Poelchau M, Qu J, Reczko M, Robertson HM, Rosendale AJ, Rosselot AE, Saccone G, Salvemini M, Savini G, Schreiner P, Scolari F, Siciliano P, Sim SB, Tsiamis G, Urena E, Vlachos IS, Werren JH, Wimmer EA, Worley KC, Zacharopoulou A, Richards S & Handler AM (2016) The whole genome sequence of the Mediterranean fruit fly, *Ceratitis capitata* (Wiedemann), reveals insights into the biology and adaptive evolution of a highly invasive pest species. *Genome Biol* 17: 192. doi:10.1186/s13059-016-1049-2.
- Peabody NC, Diao F, Luan H, Wang H, Dewey EM, Honegger H-W & White BH (2008) Bursicon functions within the *Drosophila* CNS to modulate wing expansion behavior, hormone secretion, and cell death. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 28: 14379-14391. doi:10.1523/jneurosci.2842-08.2008.
- Peabody NC, Pohl JB, Diao F, Vreede AP, Sandstrom DJ, Wang H, Zelensky PK & White BH (2009) Characterization of the decision network for wing expansion in *Drosophila* using targeted expression of the TRPM8 channel. *Journal of Neuroscience* 29: 3343-3353. doi:10.1523/jneurosci.4241-08.2009.
- Peabody NC & White BH (2013) Eclosion gates progression of the adult ecdysis sequence of *Drosophila*. *The Journal of Experimental Biology* 216: 4395-4402. doi:10.1242/jeb.091595.
- Peng Z, Cheng Y, Tan BC-M, Kang L, Tian Z, Zhu Y, Zhang W, Liang Y, Hu X, Tan X, Guo J, Dong Z, Liang Y, Bao L & Wang J (2012) Comprehensive analysis of RNA-Seq data reveals extensive RNA editing in a human transcriptome. *Nat Biotechnol* 30: 253. doi:10.1038/nbt.2122
- <https://www.nature.com/articles/nbt.2122#supplementary-information>.
- Pérez M, Wappner P & Quesada-Allué LA (2002) Catecholamine- β -alanyl ligase in the medfly *Ceratitis capitata*. *Insect Biochem Mol Biol* 32: 617-625. doi:https://doi.org/10.1016/S0965-1748(01)00140-0.
- Pérez MM, Bochicchio PA, Rabossi A & Quesada-Allué LA (2018) Extracellular activity of NBAD-synthase is responsible for colouration of brown spots in *Ceratitis capitata* wings. *Journal of Insect Physiology* 107: 224-232. doi:https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2018.04.010.
- Perez MM, Schachter J, Berni J & Quesada-Allue LA (2010) The enzyme NBAD-synthase plays diverse roles during the life cycle of *Drosophila melanogaster*. *J Insect Physiol* 56: 8-13. doi:10.1016/j.jinsphys.2009.08.018.

- Perez MM, Schachter J & Quesada-Allue LA (2004) Constitutive activity of N-beta-alanyl-catecholamine ligase in insect brain. *Neurosci Lett* 368: 186-191. doi:10.1016/j.neulet.2004.07.015.
- Petersen AJ, Katzenberger RJ & Wassarman DA (2013) The Innate Immune Response Transcription Factor Relish Is Necessary for Neurodegeneration in a Drosophila Model of Ataxia-Telangiectasia. *Genetics* 194: 133. doi:10.1534/genetics.113.150854.
- Petersen AJ, Rimkus SA & Wassarman DA (2012) ATM kinase inhibition in glial cells activates the innate immune response and causes neurodegeneration in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109: E656-664. doi:10.1073/pnas.1110470109.
- Philippe A-S, Jeanson R, Pasquaretta C, Rebaudo F, Sueur C & Mery F (2016) Genetic variation in aggregation behaviour and interacting phenotypes in *Drosophila*. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 283: 20152967. doi:10.1098/rspb.2015.2967.
- Pickrell JK, Marioni JC, Pai AA, Degner JF, Engelhardt BE, Nkadori E, Veyrieras J-B, Stephens M, Gilad Y & Pritchard JK (2010) Understanding mechanisms underlying human gene expression variation with RNA sequencing. *Nature* 464: 768. doi:10.1038/nature08872
- <https://www.nature.com/articles/nature08872#supplementary-information>.
- Pikielny CW, Hasan G, Rouyer F & Rosbash M (1994) Members of a family of *Drosophila* putative odorant-binding proteins are expressed in different subsets of olfactory hairs. *Neuron* 12: 35-49.
- Piper MD, Selman C, McElwee JJ & Partridge L (2008) Separating cause from effect: how does insulin/IGF signalling control lifespan in worms, flies and mice? *J Intern Med* 263: 179-191. doi:10.1111/j.1365-2796.2007.01906.x.
- Pokrzywa M, Dacklin I, Hultmark D & Lundgren E (2007) Misfolded transthyretin causes behavioral changes in a *Drosophila* model for transthyretin-associated amyloidosis. *European Journal of Neuroscience* 26: 913-924. doi:10.1111/j.1460-9568.2007.05728.x.
- Preat T & Goguel V (2016) Role of *Drosophila* Amyloid Precursor Protein in Memory Formation. *Frontiers in Molecular Neuroscience* 9. doi:10.3389/fnmol.2016.00142.
- Prokopy & Hendrichs (1979) Mating behaviour of *Ceratitits capitata* on a field-caged host tree. *Annals of the Entomological Society of America*. 72: 642-648.
- Pujol-Lereis LM, Fagali NS, Rabossi A, Catala A & Quesada-Allue LA (2016) Chill-coma recovery time, age and sex determine lipid profiles in *Ceratitits capitata* tissues. *J Insect Physiol* 87: 53-62. doi:10.1016/j.jinsphys.2016.02.002.
- Pujol-Lereis LM, Massaldi A, Rabossi A & Quesada-Allue LA (2010) Photosensitizing effect of hematoporphyrin IX on immature stages of *Ceratitits capitata* (Diptera: Tephritidae). *Photochem Photobiol* 86: 639-644. doi:10.1111/j.1751-1097.2009.00704.x.
- Pujol-Lereis LM, Rabossi A & Quesada-Allue LA (2014) Analysis of survival, gene expression and behavior following chill-coma in the medfly *Ceratitits capitata*: effects of population heterogeneity and age. *J Insect Physiol* 71: 156-163. doi:10.1016/j.jinsphys.2014.10.015.
- Pujol-Lereis LM, Rabossi A & Quesada-Allué LA (2012) Lipid profiles as indicators of functional senescence in the medfly. *Experimental Gerontology* 47: 465-472. doi:10.1016/j.exger.2012.04.001.
- Pujol-Lereis LM, Rabossi, A., Filiberti, A., Argaraña, C., Quesada-Allué, L.A. (2006) D. melanogaster and *H. irritans* are more sensitive to *Phloxine B* phototoxicity than *C. capitata*. *Drosophila information service* 89: 82-84.
- Quesada-Allué LA & Belocpitow E (1978) Lipid-Bound Oligosaccharides in Insects. *European Journal of Biochemistry* 88: 529-541. doi:10.1111/j.1432-1033.1978.tb12479.x.

- Quesada-Allué LA, Rabossi A., Wappner, P. (1994) La mosca del Mediterráneo, Buenos Aires, Argentina.
- Rabossi A (2001) Caracterización del proceso de degradación de tejidos larvales durante la metamorfosis en la mosca del Mediterraneo, *Ceratitis capitata* (Wiedemann), Vol. Ph. D. Dissertation: Universidad de Buenos Aires
- (ed., Buenos Aires, Argentina.
- Rabossi A, Ación L & Quesada-Allué LA (2000) Metamorphosis-associated proteolysis in *Ceratitis capitata*. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 94: 57-65. doi:10.1046/j.1570-7458.2000.00604.x.
- Rabossi A, Boccaccio GL, Wappner P & Quesada-Allué LA (1991) Morphogenesis and cuticular markers during the larval-pupal transformation of the medfly *Ceratitis capitata*. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 60: 135-141. doi:10.1111/j.1570-7458.1991.tb01532.x.
- Rabossi A, Stoka V, Puizdar V, Turk V & Quesada-Allue LA (2004) Novel aspartyl proteinase associated to fat body histolysis during *Ceratitis capitata* early metamorphosis. *Arch Insect Biochem Physiol* 57: 51-67. doi:10.1002/arch.20011.
- Rabossi A, Stoka V, Puizdar V, Turk V & Quesada-Allue LA (2008) Purification and characterization of two cysteine peptidases of the Mediterranean fruit fly *Ceratitis capitata* during metamorphosis. *Arch Insect Biochem Physiol* 68: 1-13. doi:10.1002/arch.20231.
- Rabossi A, Wappner P & Quesada- Allué LA (1992) Larva to pharate adult transformation in the medfly, *C. capitata*. *The Canadian Entomologist* 124: 1139-1147.
- Rao N. D-FF (2012) Characterisation of Predator-Directed Displays in Tephritid Flies. *Ethology* 118: 1165–1172. doi:10.1111/eth.12021.
- Ravi S, Crall JD, Fisher A & Combes SA (2013) Rolling with the flow: bumblebees flying in unsteady wakes. *Journal of Experimental Biology* 216: 4299-4309.
- Reed DE, Huang XM, Wohlschlegel JA, Levine MS & Senger K (2008) DEAF-1 regulates immunity gene expression in *Drosophila*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105: 8351. doi:10.1073/pnas.0802921105.
- Reid F, Friedman (1987) Extrication, the primary event in eclosion, and its relationship to digging, pumping and tanning in *Sarcophaga bullata*. *Journal Insect Physiology* 33: 339-348.
- Reid SNM, Fraenkel G & Friedman S (1987) Extrication, the primary event in eclosion, and its neural control in *Sarcophaga bullata*. *Journal of Insect Physiology* 33: 481-486. doi:https://doi.org/10.1016/0022-1910(87)90112-0.
- Ren Y, Zhao J & Feng J (2003) Parkin binds to alpha/beta tubulin and increases their ubiquitination and degradation. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 23: 3316-3324.
- Riemensperger T, Isabel G, Coulom H, Neuser K, Seugnet L, Kume K, Iché-Torres M, Cassar M, Strauss R, Preat T, Hirsh J & Birman S (2011) Behavioral consequences of dopamine deficiency in the *Drosophila* central nervous system. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108: 834. doi:10.1073/pnas.1010930108.
- Rivera-Ciprian JP, Aceituno-Medina M & Hernández E (2017) Influence of Pupation Substrate on Mass Production and Fitness of Adult *Anastrepha obliqua* Macquart (Diptera: Tephritidae) for Sterile Insect Technique Application. *Journal of Economic Entomology* 110: 2397-2405. doi:10.1093/jee/tox279.
- Robinson MD, McCarthy DJ & Smyth GK (2010) edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics* 26: 139-140. doi:10.1093/bioinformatics/btp616.

- Rogers I, Kerr F, Martinez P, Hardy J, Lovestone S & Partridge L (2012) Ageing Increases Vulnerability to A β 42 Toxicity in *Drosophila*. *PLoS One* 7: e40569. doi:10.1371/journal.pone.0040569.
- Rueppell O, Christine S, Mulcrone C & Groves L (2007) Aging without functional senescence in honey bee workers. *Current biology : CB* 17: R274-R275. doi:10.1016/j.cub.2007.02.015.
- Rumpf S, Lee SB, Jan LY & Jan YN (2011) Neuronal remodeling and apoptosis require VCP-dependent degradation of the apoptosis inhibitor DIAP1. *Development* 138: 1153-1160. doi:10.1242/dev.062703.
- Rutte C, Taborsky M & Brinkhof MWG (2006) What sets the odds of winning and losing? *Trends in Ecology & Evolution* 21: 16-21. doi:10.1016/j.tree.2005.10.014.
- Sachser N, Hennessy MB & Kaiser S (2011) Adaptive modulation of behavioural profiles by social stress during early phases of life and adolescence. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* 35: 1518-1533. doi:https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2010.09.002.
- Sachser N, Kaiser S & Hennessy Michael B (2013) Behavioural profiles are shaped by social experience: when, how and why. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 368: 20120344. doi:10.1098/rstb.2012.0344.
- Saltz JB (2011) Natural genetic variation in social environment choice: context-dependent gene–environment correlation in *Drosophila Melanogaster*. *Evolution* 65: 2325-2334. doi:10.1111/j.1558-5646.2011.01295.x.
- Saltz JB (2013) Genetic composition of social groups influences male aggressive behaviour and fitness in natural genotypes of *Drosophila melanogaster*. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 280: 20131926. doi:10.1098/rspb.2013.1926.
- Salvemini M, Arunkumar KP, Nagaraju J, Sanges R, Petrella V, Tomar A, Zhang H, Zheng W & Saccone G (2014) De Novo Assembly and Transcriptome Analysis of the Mediterranean Fruit Fly *Ceratitis capitata* Early Embryos. *PLoS One* 9: e114191. doi:10.1371/journal.pone.0114191.
- Sane SP, Balebail S & Raja SK (2018) Visual control of landing maneuvers in houseflies on vertical and inverted surfaces. *bioRxiv*: 448472.
- Schachter J, Perez MM & Quesada-Allue LA (2007) The role of N-beta-alanyldopamine synthase in the innate immune response of two insects. *J Insect Physiol* 53: 1188-1197. doi:10.1016/j.jinsphys.2007.06.010.
- Schleicher TR, Yang J, Freudzon M, Rembisz A, Craft S, Hamilton M, Graham M, Mlambo G, Tripathi AK, Li Y, Cresswell P, Sinnis P, Dimopoulos G & Fikrig E (2018) A mosquito salivary gland protein partially inhibits *Plasmodium* sporozoite cell traversal and transmission. *Nat Commun* 9: 2908. doi:10.1038/s41467-018-05374-3.
- Schlenke TA, Morales J, Govind S & Clark AG (2007) Contrasting Infection Strategies in Generalist and Specialist Wasp Parasitoids of *Drosophila melanogaster*. *PLOS Pathogens* 3: e158. doi:10.1371/journal.ppat.0030158.
- Seligman I & Doy FA (1973) Hormonal regulation of disaggregation of cellular fragments in the haemolymph of *Lucilia cuprina*. *Journal of Insect Physiology* 19: 125-135.
- Seligman I, Filshie B, Doy F & Crossley A (1975) Hormonal control of morphogenetic cell death of the wing hypodermis in *Lucilia cuprina*. *Tissue and Cell* 7: 281-296.
- Shafer OT, Helfrich-Förster C, Renn SCP & Taghert PH (2006) Reevaluation of *Drosophila melanogaster*'s neuronal circadian pacemakers reveals new neuronal classes. *Journal of Comparative Neurology* 498: 180-193. doi:10.1002/cne.21021.
- Shaw PJ, Cirelli C, Greenspan RJ & Tononi G (2000) Correlates of Sleep and Waking in *Drosophila melanogaster*. *Science* 287: 1834. doi:10.1126/science.287.5459.1834.
- Shelly TE (1987) Lek behaviour of a Hawaiian *Drosophila*: male spacing, aggression and female visitation. *Animal Behaviour* 35: 1394-1404. doi:https://doi.org/10.1016/S0003-3472(87)80012-X.

- Shelly TE (2000) Male signalling and lek attractiveness in the Mediterranean fruit fly. *Animal Behaviour* 60: 245-251. doi:<https://doi.org/10.1006/anbe.2000.1470>.
- Shelly TE (2001) Lek size and female visitation in two species of tephritid fruit flies. *Animal Behaviour* 62: 33-40. doi:<https://doi.org/10.1006/anbe.2000.1723>.
- Shelly TE (2018) Sexual Selection on Leks: A Fruit Fly Primer. *Journal of Insect Science* 18: 9-9. doi:[10.1093/jisesa/iey048](https://doi.org/10.1093/jisesa/iey048).
- Shelly TE & Whittier TS (1997) Lek behavior of insects: The Evolution of Mating Systems in Insects and Arachnids (ed. by BJ Crespi & JC Choe) Cambridge University Press, Cambridge, pp. 273-293.
- Shiloh Y & Lederman HM (2017) Ataxia-telangiectasia (A-T): An emerging dimension of premature ageing. *Ageing research reviews* 33: 76-88. doi:<https://doi.org/10.1016/j.arr.2016.05.002>.
- Shultzaberger RK, Johnson SJ, Wagner J, Ha K, Markow TA & Greenspan RJ (2019) Conservation of the behavioral and transcriptional response to social experience among Drosophilids. *Genes, Brain and Behavior* 18: e12487. doi:[10.1111/gbb.12487](https://doi.org/10.1111/gbb.12487).
- Siciliano P, He XL, Woodcock C, Pickett JA, Field LM, Birkett MA, Kalinova B, Gomulski LM, Scolari F, Gasperi G, Malacrida AR & Zhou JJ (2014) Identification of pheromone components and their binding affinity to the odorant binding protein CcapOBP83a-2 of the Mediterranean fruit fly, *Ceratitis capitata*. *Insect Biochem Mol Biol* 48: 51-62. doi:[10.1016/j.ibmb.2014.02.005](https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2014.02.005).
- Simon AF, Liang DT & Krantz DE (2006) Differential decline in behavioral performance of *Drosophila melanogaster* with age. *Mech Ageing Dev* 127: 647-651. doi:[S0047-6374\(06\)00071-6 \[pii\]](https://doi.org/10.1016/j.mad.2006.02.006)
- 10.1016/j.mad.2006.02.006.
- Smith DC & Prokopy RJ (1980) Mating behavior of *Rhagoletis pomonella* (diptera: tephritidae) VI. Site of early-season encounters. *The Canadian Entomologist* 112: 585-590. doi:[10.4039/Ent112585-6](https://doi.org/10.4039/Ent112585-6).
- Sohal R (2002) Oxidative stress hypothesis of aging.
- Sohal RS (1986) The Rate of Living Theory: A Contemporary Interpretation: Insect Aging: Strategies and Mechanisms (ed. by K-G Collatz & RS Sohal) Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp. 23-44.
- Sohal RS & Orr WC (2012) The redox stress hypothesis of aging. *Free Radical Biology and Medicine* 52: 539-555.
- Sørensen JG & Loeschcke V (2001) Larval crowding in *Drosophila melanogaster* induces Hsp70 expression, and leads to increased adult longevity and adult thermal stress resistance. *Journal of Insect Physiology* 47: 1301-1307. doi:[https://doi.org/10.1016/S0022-1910\(01\)00119-6](https://doi.org/10.1016/S0022-1910(01)00119-6).
- Stagni V, Cirotti C & Barilà D (2018) Ataxia-Telangiectasia Mutated Kinase in the Control of Oxidative Stress, Mitochondria, and Autophagy in Cancer: A Maestro With a Large Orchestra. *Frontiers in Oncology* 8. doi:[10.3389/fonc.2018.00073](https://doi.org/10.3389/fonc.2018.00073).
- Stefana MI, Driscoll PC, Obata F, Pengelly AR, Newell CL, MacRae JI & Gould AP (2017) Developmental diet regulates *Drosophila* lifespan via lipid autotoxins. *Nat Commun* 8: 1384. doi:[10.1038/s41467-017-01740-9](https://doi.org/10.1038/s41467-017-01740-9).
- Stokes BA, Yadav S, Shokal U, Smith LC & Eleftherianos I (2015) Bacterial and fungal pattern recognition receptors in homologous innate signaling pathways of insects and mammals. *Frontiers in microbiology* 6. doi:[10.3389/fmicb.2015.00019](https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00019).
- Strausfeld NJ & Gronenberg W (1990) Descending neurons supplying the neck and flight motor of Diptera: organization and neuroanatomical relationships with visual pathways. *Journal of Comparative Neurology* 302: 954-972.

- Sulkowski MJ, Iyer SC, Kurosawa MS, Iyer EPR & Cox DN (2011) Turtle functions downstream of Cut in differentially regulating class specific dendrite morphogenesis in *Drosophila*. *PLoS One* 6: e22611.
- Taghli-Lamalle O, Akasaka T, Hogg G, Nudel U, Yaffe D, Chamberlain JS, Ocorr K & Bodmer R (2008) Dystrophin deficiency in *Drosophila* reduces lifespan and causes a dilated cardiomyopathy phenotype. *Aging Cell* 7: 237-249. doi:10.1111/j.1474-9726.2008.00367.x.
- Tain LS, Chowdhury RB, Tao RN, Plun-Favreau H, Moiso N, Martins LM, Downward J, Whitworth AJ & Tapon N (2009) *Drosophila* HtrA2 is dispensable for apoptosis but acts downstream of PINK1 independently from Parkin. *Cell Death And Differentiation* 16: 1118. doi:10.1038/cdd.2009.23
- <https://www.nature.com/articles/cdd200923#supplementary-information>.
- Takahashi H, Furuya R, Yano T, Ito K, Takahata T & Shimoyama I (2017) Maximum force capacity of legs of a fruit fly during landing motion: 2017 19th International Conference on Solid-State Sensors, Actuators and Microsystems (TRANSDUCERS) (ed., pp. 1061-1064.
- Thistle R, Cameron P, Ghorayshi A, Dennison L & Scott K (2012) Contact chemoreceptors mediate male-male repulsion and male-female attraction during *Drosophila* courtship. *Cell* 149: 1140-1151. doi:10.1016/j.cell.2012.03.045.
- Thompson FC & Society NAD (1998) Fruit Fly Expert Identification System and Systematic Information Database: A Resource for Identification and Information on Fruit Flies and Maggots, with Information on Their Classification, Distribution and Documentation. Backhuys Pub. for the North American Dipterists' Society.
- Tinbergen N (1951) The study of instinct. Clarendon Press, Oxford.
- Tinbergen N (1963) On aims and methods of Ethology. *Zeitschrift für Tierpsychologie* 20: 410-433. doi:10.1111/j.1439-0310.1963.tb01161.x.
- Tolmasky DS, Rabossi A & Quesada-Allue LA (2001) Synthesis and mobilization of glycogen during metamorphosis of the medfly *Ceratitis capitata*. *Arch Biochem Biophys* 392: 38-47. doi:10.1006/abbi.2001.2394.
- Toma DP, White KP, Hirsch J & Greenspan RJ (2002) Identification of genes involved in *Drosophila melanogaster* geotaxis, a complex behavioral trait. *Nat Genet* 31: 349-353. doi:10.1038/ng893.
- Touhara K & Vosshall LB (2009) Sensing Odorants and Pheromones with Chemosensory Receptors. *Annual Review of Physiology* 71: 307-332. doi:10.1146/annurev.physiol.010908.163209.
- Tower J, Agrawal S, Alagappan MP, Bell HS, Demeter M, Havanoor N, Hegde VS, Jia Y, Kothawade S, Lin X, Nadig C, Rajashekharappa NS, Rao D, Rao SS, Sancheti P, Saria A, Shantharamu NH, Sharma V, Tadepalli K & Varma A (2019) Behavioral and molecular markers of death in *Drosophila melanogaster*. *Experimental Gerontology* 126: 110707. doi:https://doi.org/10.1016/j.exger.2019.110707.
- Trannoy S, Penn J, Lucey K, Popovic D & Kravitz EA (2016) Short and long-lasting behavioral consequences of agonistic encounters between male *Drosophila melanogaster*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 113: 4818-4823. doi:10.1073/pnas.1520953113.
- Trapnell C, Pachter L & Salzberg SL (2009) TopHat: discovering splice junctions with RNA-Seq. *Bioinformatics* 25: 1105-1111. doi:10.1093/bioinformatics/btp120.
- True JR, Edwards KA, Yamamoto D & Carroll SB (1999) *Drosophila* wing melanin patterns form by vein-dependent elaboration of enzymatic prepatterns. *Curr Biol* 9: 1382-1391.
- Truman JW (1990) Metamorphosis of the central nervous system of *Drosophila*. *Journal of Neurobiology* 21: 1072-1084. doi:10.1002/neu.480210711.

- Truman JW & Riddiford LM (1999) The origins of insect metamorphosis. *Nature* 401: 447. doi:10.1038/46737.
- Truman JW & Riddiford LM (2002) Endocrine Insights into the Evolution of Metamorphosis in Insects. *Annual Review of Entomology* 47: 467-500. doi:10.1146/annurev.ento.47.091201.145230.
- Truman JW, Rountree DB, Reiss SE & Schwartz LM (1983) Ecdysteroids regulate the release and action of eclosion hormone in the tobacco hornworm, *Manduca sexta* (L.). *Journal of Insect Physiology* 29: 895-900. doi:https://doi.org/10.1016/0022-1910(83)90052-5.
- Tsoumani KT & Mathiopoulos KD (2012) Genome size estimation with quantitative real-time PCR in two Tephritidae species: *Ceratitis capitata* and *Bactrocera oleae*. *Journal of Applied Entomology* 136: 626-631. doi:10.1111/j.1439-0418.2011.01684.x.
- Turner BM (2007) Defining an epigenetic code. *Nature Cell Biology* 9: 2. doi:10.1038/ncb0107-2.
- Ugur B, Chen K & Bellen HJ (2016) *Drosophila* tools and assays for the study of human diseases. *Disease Models & Mechanisms* 9: 235. doi:10.1242/dmm.023762.
- van der Voet M, Harich B, Franke B & Schenck A (2015) ADHD-associated dopamine transporter, latrophilin and neurofibromin share a dopamine-related locomotor signature in *Drosophila*. *Mol Psychiatry* 21: 565. doi:10.1038/mp.2015.55
- <https://www.nature.com/articles/mp201555#supplementary-information>.
- Veenstra JA (2009) Peptidergic paracrine and endocrine cells in the midgut of the fruit fly maggot. *Cell and Tissue Research* 336: 309-323. doi:10.1007/s00441-009-0769-y.
- Volkenhoff A, Weiler A, Letzel M, Stehling M, Klämbt C & Schirmeier S (2015) Glial Glycolysis Is Essential for Neuronal Survival in *Drosophila*. *Cell Metabolism* 22: 437-447. doi:10.1016/j.cmet.2015.07.006.
- Walter MF, Zeineh LL, Black BC, Mclvor WE, Wright TR & Biessmann H (1996) Catecholamine metabolism and in vitro induction of premature cuticle melanization in wild type and pigmentation mutants of *Drosophila melanogaster*. *Arch Insect Biochem Physiol* 31: 219-233. doi:10.1002/(SICI)1520-6327(1996)31:2<219::AID-ARCH9>3.0.CO;2-U.
- Wang L & Anderson DJ (2009) Identification of an aggression-promoting pheromone and its receptor neurons in *Drosophila*. *Nature* 463: 227. doi:10.1038/nature08678
- <https://www.nature.com/articles/nature08678#supplementary-information>.
- Wang L, Dankert H, Perona P & Anderson DJ (2008) A common genetic target for environmental and heritable influences on aggressiveness in *Drosophila*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105: 5657-5663. doi:10.1073/pnas.0801327105.
- Wang L, Han X, Mehren J, Hiroi M, Billeter J-C, Miyamoto T, Amrein H, Levine JD & Anderson DJ (2011) Hierarchical chemosensory regulation of male-male social interactions in *Drosophila*. *Nature neuroscience* 14: 757-762. doi:10.1038/nn.2800.
- Wang Q, Hasan G & Pikielny CW (1999) Preferential Expression of Biotransformation Enzymes in the Olfactory Organs of *Drosophila melanogaster*, the Antennae. *The Journal of Biological Chemistry* 274: 10309-10315. doi:10.1074/jbc.274.15.10309.
- Wang Z, Gerstein M & Snyder M (2009) RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nature reviews. Genetics* 10: 57-63. doi:10.1038/nrg2484.
- Wappner, Hopkins T, Kramer K, Cladera, Manso & Quesada-Allue L (1996) Role of catecholamines and β -alanine in puparial color of wild-type and melanic mutants of the mediterranean fruit fly (*Ceratitis capitata*). *J. Insect Physiol.* 42: 455-462. doi:10.1016/0022-1910(95)00131-x.
- Warthen JD, Lee C-J, Jang EB, Lance DR & McInnis DO (1997) Volatile, Potential Attractants from Ripe Coffee Fruit for Female Mediterranean Fruit Fly. *Journal of Chemical Ecology* 23: 1891-1900. doi:10.1023/b:joec.0000006458.02342.61.

- White BH & Ewer J (2014) Neural and hormonal control of postecdysial behaviors in insects. *Annual Review of Entomology* 59: 363-381. doi:10.1146/annurev-ento-011613-162028.
- White IM & Elson-Harris MM (1992) *Fruit Flies of Economic Significance: Their Identification and Bionomics*. CAB International, Wallingford, Oxon, UK.
- Whittier TS, Kaneshiro KY & Prescott LD (1992) Mating Behavior of Mediterranean Fruit Flies (Diptera: Tephritidae) in a Natural Environment. *Annals of the Entomological Society of America* 85: 214-218. doi:10.1093/aesa/85.2.214.
- Wicker-Thomas C (2007) Pheromonal communication involved in courtship behavior in Diptera.
- Wigglesworth VB (1977) *The Principles of Insect Physiology*, London.
- Wilkinson G & Johns P (2005) Sexual selection and the evolution of mating systems in flies, pp. 312-339.
- Winnebeck EC, Millar CD & Warman GR (2010) Why does insect RNA look degraded? *Journal of insect science (Online)* 10: 159-159. doi:10.1673/031.010.14119.
- Wu Y, Bolduc FV, Bell K, Tully T, Fang Y, Sehgal A & Fischer JA (2008) A *Drosophila* model for Angelman syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 12399-12404. doi:10.1073/pnas.0805291105.
- Wyatt TD (2003) *Pheromones and Animal Behaviour: Communication by Smell and Taste*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Xia X, Chen W, McDermott J & Han J-DJ (2017) Molecular and phenotypic biomarkers of aging. *F1000Research* 6: 860-860. doi:10.12688/f1000research.10692.1.
- Yap S, Fanson BG & Taylor PW (2015) Mating Reverses Actuarial Aging in Female Queensland Fruit Flies. *PLoS One* 10: e0132486. doi:10.1371/journal.pone.0132486.
- Yeung KC, Rose DW, Dhillon AS, Yaros D, Gustafsson M, Chatterjee D, McFerran B, Wyche J, Kolch W & Sedivy JM (2001) Raf kinase inhibitor protein interacts with NF-kappaB-inducing kinase and TAK1 and inhibits NF-kappaB activation. *Molecular and cellular biology* 21: 7207-7217. doi:10.1128/mcb.21.21.7207-7217.2001.
- Yurkovic A, Wang O, Basu AC & Kravitz EA (2006) Learning and memory associated with aggression in *Drosophila melanogaster*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103: 17519. doi:10.1073/pnas.0608211103.
- Yuval B, Kaspi R, Field SA, Blay S & Taylor P (2002) Effects of Post-Teneral Nutrition on Reproductive Success of Male Mediterranean Fruit Flies (Diptera: Tephritidae). *The Florida Entomologist* 85: 165-170.
- Yuval B, Kaspi R, Shloush S & Warburg MS (1998) Nutritional reserves regulate male participation in Mediterranean fruit fly lek. *Ecological Entomology* 23: 211-215. doi:10.1046/j.1365-2311.1998.00118.x.
- Zajitschek F, Zajitschek S & Bonduriansky R (2019) Senescence in wild insects: Key questions and challenges. *Functional Ecology* 0. doi:10.1111/1365-2435.13399.
- Zangar RC, Davydov DR & Verma S (2004) Mechanisms that regulate production of reactive oxygen species by cytochrome P450. *Toxicol Appl Pharmacol* 199: 316-331. doi:https://doi.org/10.1016/j.taap.2004.01.018.
- Zdarek J & Denlinger DL (1992) Ecdysis behavior in tsetse (Diptera: Glossinidae): Extrication from the puparium and expansion of the adult. *Journal of Insect Behavior* 5: 657-668.
- Zdarek J & Denlinger DL (1993) Metamorphosis behaviour and regulation in tsetse flies (*Glossina* spp.) (Diptera: Glossinidae): A review. *Bulletin of Entomological Research* 83: 447-461. doi:10.1017/s0007485300029369.
- Ždarek J & Denlinger DL (1987) Postecdysis behavior of the flesh fly, *Sarcophaga crassipalpis*: A comparison of wild-type and unicorn mutants. *Insect Biochemistry and Physiology* 4: 101-106.

- Ždarek JAN, Reid S & Fraenkel G (1986) How does an eclosing fly deal with obstacles? *Physiological Entomology* 11: 107-114. doi:10.1111/j.1365-3032.1986.tb00395.x.
- Zerofsky M, Harel E, Silverman N & Tatar M (2005) Aging of the innate immune response in *Drosophila melanogaster*. *Aging Cell* 4: 103-108. doi:10.1111/j.1474-9728.2005.00147.x.
- Zhou Y, Fu W-B, Si F-L, Yan Z-T, Zhang Y-J, He Q-Y & Chen B (2019) UDP-glycosyltransferase genes and their association and mutations associated with pyrethroid resistance in *Anopheles sinensis* (Diptera: Culicidae). *Malar J* 18: 62. doi:10.1186/s12936-019-2705-2.
- Zou S, Liedo P, Altamirano-Robles L, Cruz-Enriquez J, Morice A, Ingram DK, Kaub K, Papadopoulos N & Carey JR (2011) Recording Lifetime Behavior and Movement in an Invertebrate Model. *PLoS One* 6: e18151. doi:10.1371/journal.pone.0018151.